DIE
SALZE DER MILCH
UND
IHRE BEZIEHUNGEN ZU DEM VERHALTEN
DES
KASEÏNS.

INAUGURAL-DISSERTATION
ZUR
ERLANGUNG DER DOCTORWÜRDE
BEI DER
HOHEN PHILOSOPHISCHEN FACULTÄT ZU ERLANGEN
EINGEREICHT VON
FRIEDRICH SÖLDNER
AUS
NÖRDLINGEN.

LANGENSALZA,
DRUCK VON HERMANN BEYER & SÖHNE.
1888.

DIE
SALZE DER MILCH
UND
IHRE BEZIEHUNGEN ZU DEM VERHALTEN
DES
KASEÏNS.

INAUGURAL-DISSERTATION
ZUR
ERLANGUNG DER DOCTORWÜRDE
BEI DER
HOHEN PHILOSOPHISCHEN FACULTÄT ZU ERLANGEN
EINGEREICHT VON
FRIEDRICH SÖLDNER
AUS
NÖRDLINGEN.

LANGENSALZA,
DRUCK VON HERMANN BEYER & SÖHNE.
1888.

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41546420_0096

Die Aschenbestandteile der Kuhmilch üben auf das Verhalten derselben nach vielen Richtungen hin einen bestimmten Einfluſs aus. Ein besonderes Interesse bieten die Phosphate der Milch dar, welche zu der amphoteren Reaktion, zu den Gerinnungserscheinungen der Milch und zu einigen Eigenschaften des Kaseïns schon mehrfach in Beziehung gebracht wurden.

Betrachtet man das Verhältnis der Basen zu den Säuren der Milchasche, so fällt hierbei der groſse Überschuſs an Basen auf. Eine solche Studie sei zunächst in folgendem an zwei von mir ausgeführte Analysen der Milchaschen geknüpft. Über die angewandten Untersuchungsmethoden bei Ausführung dieser Analysen ist folgendes kurz zu bemerken:

200 cc Milch wurden unter Zusatz von kohlensaurem Natron eingedampft und verascht; die salpetersaure Lösung der Asche neutralisiert und die Phosphorsäure mittelst Eisenchlorid und essigsaurem Natron in essigsaurer Lösung abgeschieden; im Niederschlag die Phosphorsäure nach der Molybdänmethode bestimmt in einem Teil des Filtrates Calciumoxyd als Oxalat, Mangnesiumoxyd als Ammonium-Magnesiumphosphat gefällt; in einem anderen Teil der salpetersauren Lösung der Milchasche wurde das Chlor als Chlorsilber bestimmt.

Zur Bestimmung der Alkalien wurden 100 cc Milch mit Zusatz von Ätzbaryt eingedampft und verascht, die Asche in Salzsäure gelöst, Phosphorsäure, Schwefelsäure, Kalk und Magnesia in bekannter Weise durch Baryt entfernt, die Alkalien als Chloralkalien gewogen und die Menge Kaliumoxyd aus dem Platingehalt der abgeschiedenen Kaliumplatinchloridverbindung ermittelt.

Die in der Milchasche enthaltene Schwefelsäure-Menge wurde, da Schwefelsäure, wie es in der Regel der Fall ist, in dem Milch-

serum nicht enthalten war, — die Schwefelsäure der Asche entstammt dem Schwefel der Eiweifskörper — unberücksichtigt gelassen, ebenso wurde der minimale Eisengehalt, als hier weder von Belang noch von Interesse, nicht in Rechnung gezogen.

Es enthielt 1 l Milch:

	I.	II.
Chlor	0,820 g	0,980 g
Phosphorsäure	2,437 „	2,400 „
Kaliumoxyd	1,885 „	1,720 „
Natriumoxyd	0,465 „	0,510 „
Calciumoxyd	1,720 „	1,980 „
Magnesiumoxyd	0,205 „	0,200 „

Denkt man sich nun das vorhandene Chlor zunächst an Natrium, den Rest des Chlors an Kalium gebunden, die Phosphorsäure als Tricalcium- und Trimagnesiumphosphat vorhanden, und den sich noch ergebenden Rest an Phosphorsäure in Verbindung mit noch verfügbarem Kalium, so würden in einem Liter Milch enthalten sein:

Hiernach müfste:

	I.	II.
Clornatrium	0,877 g	0,962 g
Chlorkalium	0,603 „	0,830 „
Kaliumoxyd	0,033 „	0,223 „
Tricalciumphosphat	3,176 „	3,652 „
Trimagnesiumphosphat	0,448 „	0,436 „
Trikaliumphosphat	2,212 „	1,467 „

Hiernach müfste:

1. die ganze Menge des Calcium- und Magnesiumoxydes als unlösliches Triphosphat in der Milch suspendiert, oder diese in Wasser an und für sich unlöslichen Verbindungen müfsten als solche durch ein besonderes Lösungsmittel in Lösung erhalten sein (etwa wie eine alkalische Lösung von citronensaurem Ammon gefälltes Tricalciumphosphat zu lösen vermag);

2. müfste die Milch, weil nur Tri-Alkaliphosphate und freies Kaliumoxyd (resp. -Hydrat) enthaltend, stark alkalisch reagieren, während dieselbe in Wirklichkeit bekanntlich amphotere Reaktion zeigt.

Bei dieser Betrachtung wurden indes einige Thatsachen unberücksichtigt gelassen, welche bei dem Studium des Verhaltens der Milchasche berücksichtigt werden müssen.

I. Ist nicht alle Phosphorsäure der Milchasche als solche in der Milch enthalten; ein Teil der in der Milchasche gefundenen Phosphorsäure ist erst bei der Veraschung aus dem Phosphor des Kaseïns entstanden.

Nimmt man den Kaseïngehalt der Milch zu 3 pCt., den Phosphorgehalt des Kaseïns mit Hammarsten zu 0,847 pCt. an, so würden 0,581 g Phosphorsäure pro Liter erst durch die Veraschung entstanden sein und sich die Menge der in der Milch wirklich vorhandenen Phosphorsäure zu I 1,856, II 1,819 berechnen: demnach rund 25 pCt. der Gesamtphosphorsäure als auf den Phosphor des Kaseïns treffend abzurechnen und die Aschenbestandteile wie folgt zu gruppieren sein:

	I.	II.
Chlornatrium	0,877 g	0,962 g
Chlorkalium	0,603 „	0,830 „
Trikaliumphosphat	0,478 „	—
Kaliumoxyd	1,185 „	1,196 „
Trimagnesiumphosphat	0,447 „	0,270 „
Magnesiumoxyd	—	0,076 „
Tricalciumphosphat	3,173 „	3,653 „

Hiernach würde die Hauptmenge (Anal. I) oder die ganze Menge (Anal. II) des nicht an Chlor gebundenen Kaliums als Kaliumoxyd resp. als Kaliumhydroxyd vorhanden sein, das Verhältnis der Säuren zu den Basen also noch weiter zu gunsten des Vorwaltens der Basen verschoben, das Gelöstsein der Kalksalze noch unwahrscheinlicher und die anzunehmende Alkalescenz würde mit der thatsächlichen noch mehr in Widerspruch stehen, als wie in unserer früheren Betrachtungsweise ausgeführt wurde.

II. Zu den in der Milch enthaltenen Säuren mufs auch das Kaseïn gerechnet werden, welchem unzweifelhaft die Fähigkeit zukommt, mit den Basen der Milch salzartige Verbindungen einzugehen. Dafs das Kaseïn die Rolle einer Säure spielt, hat Hammarsten,[1]) welchem wir die genauesten und inhaltreichsten Untersuchungen über die Eiweifskörper der Milch verdanken, gezeigt:

1) Zur Kenntnis des Kaseïns und der Wirkung des Labferments. Festschrift. Upsala 1877, S. 20.

das rein dargestellte Kaseïn reagiert gegen Lackmus ausgesprochen sauer, es bindet Ätzkalk unter Bildung einer sauer reagierenden Verbindung, und es treibt Kohlensäure aus Calciumkarbonat aus. Das Kaseïn dialysierter Kaseïnkalklösungen enthielt jedoch nach Hammarsten nur 0,8—1,2 pCt. Calciumoxyd. Diesem Befunde nach würde das Basenbindungsvermögen des Kaseïns bei weitem nicht ausreichend sein, um die Vorstellung zu rechtfertigen: In der Milch sind bei amphoterer Reaktion derselben, Kalk- und Magnesiasalze gelöst vorhanden; der Hauptmenge nach als Monophosphate oder zum geringeren Teile als Diphosphate, soweit die Löslichkeit letzterer es gestattet. Bei einem Kaseïngehalte der Milch von 3 pCt. würden 0,360 g Calciumoxyd (Kaseïnkalk nach Hammarsten 1,2 pCt. Calciumoxyd) pro Liter von dem Kaseïn gebunden werden können, während wenn man sich nur das Tricalciumphosphat allein — Magnesia- und Alkalitriphosphat, sowie überschüssiges Kaliumoxyd unberücksichtigt gelassen — als Monophosphat denkt, 1,10 (Anal. I) oder 1,3 (Anal. II) g Calciumoxyd durch das Kaseïn zu binden wären.

Nachdem das Basenbindungsvermögen des Kaseïns von Hammarsten in der Weise festgestellt wurde, dafs er „möglichst reines Kaseïn in wenig Kalkwasser löste und den überschüssigen Kalk durch Dialyse zu entfernen sich bemühte,“[1]) erscheint es nicht festgestellt, ob das Kaseïn unter besonderen oder anderen als hier eingehaltenen Bedingungen nicht mehr Calciumoxyd zu binden vermöge. Meine nach dieser Richtung angestellten Versuche ergaben folgende Resultate:

Bestimmung der Basizität des Kaseïns durch Bestimmung der Kohlensäuremenge, welche Kaseïn aus kohlensaurem Kalk austreibt:

Das zu den Versuchen verwendete Kaseïn wurde genau nach der Vorschrift Hammarstens[2]) dargestellt, die hier kurz mitgeteilt sei. Die mit 4 Volumen destilliertem Wasser verdünnte frische Kuhmilch wird mit Essigsäure zur Gerinnung gebracht (für je 100 ccm frischer Milch sind in der Regel 8 ccm Normal-Essigsäure zur vollständigen Ausfällung des Kaseïns erforderlich, wobei nur

1) a. a. O. S. 20.
2) Festschrift S. 7.

ein kleiner Überschufs an Säure vorhanden ist). Das ausgeschiedene Kaseïn wird mit destilliertem Wasser durch Dekantation möglichst rasch ausgewaschen, auf Leinwand gesammelt, abgepreſst, in der Reibschale fein zerrieben und mit soviel verdünnter Natronlauge gelöst, dafs die Lösung schwach saure Reaktion zeigt. Die mehrfach durch Papier filtrierte, opalisierende Flüssigkeit, entsprechend verdünnt, wird mit Essigsäure nochmals gefällt, der Niederschlag auf Papierfilter gesammelt, unter Wasser fein zerrieben und auf einem Filter mit destilliertem Wasser ausgewaschen. Der von dem Filter genommene Rückstand wird wieder fein zerrieben, in Natronlauge unter Erhaltung der sauren Reaktion der Flüssigkeit gelöst, zum drittenmale noch mit Essigsäure gefällt, der Niederschlag, wie bei der zweiten Fällung angegeben, ausgewaschen, mit dem Papierfilter soweit gepreſst, dafs sich derselbe vom Papier gut abheben läfst. Das so erhaltene Kaseïn wird schliefslich mit 97prozentigem Alkohol verrieben, die Emulsion rasch auf Filter gebracht, der Rückstand mit Alkohol, hierauf mit Äther gewaschen, der Niederschlag in der Reibschale verrieben und unter der Luftpumpe über Schwefelsäure von Äther und Wasser vollständig befreit. Das so erhaltene Kaseïn stellt ein staubfreies, schneeweifses Pulver dar.

Zur Gewinnung von reinem Kalkkarbonat wurde eine Lösung reinsten Chlorcalciums mit durch wiederholtes Umkrystallisieren gereinigtem kohlensauren Natron heifs gefällt, der Niederschlag durch Dekantation mit destilliertem Wasser ausgewaschen und der erhaltene kohlensaure Kalk als feinster Schlamm aufbewahrt.

Zur Bestimmung der aus kohlensaurem Kalk durch Kaseïn ausgetriebenen Kohlensäuremenge diente der bekannte Apparat, welchen Fresenius[1]) zur Ausführung der Kohlensäurebestimmung nach der Methode von Kolbe angegeben hat (Absorption der Kohlensäure in Natronkalkröhren).

Das abgewogene mit Wasser durchfeuchtete Kaseïn wurde in dem Zersetzungskolben mit einer Aufschlämmung von kohlensaurem Kalk — enthaltend circa 1 g kohlensauren Kalk — mittelst des Hahntrichters zusammengebracht, und die Zersetzung, welche unter Aufschäumen erfolgt, durch entsprechendes Erhitzen der Mischung

1) Fresenius: Anleitung zur quant. chem. Anal. 1875, S. 449.

reguliert, und schliefslich das Gemisch im Kochsalzbade zum Kochen erhitzt. Das in dem Zersetzungskolben zurückbleibende Kaseïn stellt eine in der Wärme plastische Masse dar, welche beim Erkalten hart und spröde wird und sich in Wasser nur sehr langsam wieder löst. Es wurden durch Kaseïn aus kohlensaurem Kalk folgende Mengen Kohlensäure ausgetrieben:

No.	Angewandtes Kaseïn g	Kohlensäure g	Kohlensäure in pCt. des angewandten Kaseïns
1	5,517	0,1059	1,92
2	5,614	0,1167	2,09
3	5,434	0,1150	2,05
4	4,894	0,0944	1,93
5	2,753	0,0547	1,99
6	7,948	0,1470	1,85

100 g Kaseïn treiben aus kohlensaurem Kalk im Mittel der wie ersichtlich gut übereinstimmenden Versuche 1,97 g Kohlensäure aus, entsprechend 2,39 g Calciumoxyd, welche von dem Kaseïn gebunden wurden.

Die auf diese Weise durch Kochen von Kaseïn mit einer Aufschlämmung von kohlensaurem Kalk entstehende Kaseïnkalkverbindung, resp. eine solche von gleichem Kalkgehalt, läfst sich auch auf eine andere Weise darstellen.

Kaseïnkalklösungen werden erhalten, wenn man reines pulverförmiges, trockenes Kasein zunächst mit Wasser zu einem gleichförmigen Brei zerreibt und dann unter fortwährendem Reiben Kalkwasser oder verdünnte Kalkmilch in kleinen Anteilen dem Brei hinzufügt.

Zur Darstellung solcher Kaseïnkalkverbindungen benutzte ich Ätzkalk, welchen ich durch Glühen von gefälltem reinen kohlensauren Kalk dargestellt hatte.

In solchen Fällen, wo es sich um die Kaseïnkalkverbindung von bestimmtem Kalkgehalt handelte, wurde eine gewogene Menge des kohlensauren Kalkes im Platintiegel über dem Gebläse ätzend gebrannt, der Glührückstand in Wasser aufgeschlämmt und in der beschriebenen Weise mit der gewogenen Kaseïnmenge zusammengerührt. Kalkarme Kalkkaseïnverbindungen reagieren gegen Lackmus sauer. Bei einem gewissen Kalkgehalt reagiert die Verbindung neutral und bei einem höheren Kalkgehalt mehr oder weniger

gegen Lackmus alkalisch. Eine gegen Lackmus ausgesprochen alkalisch reagierende Kaseïnkalkverbindung rötet aber nicht Phenolphtaleïn, verhält sich also gegen diese beiden Indikatoren etwa wie eine Lösung von Dinatriumphosphat (Dinatriumphosphatlösungen röten zwar auch Phenolphtaleïn, aber ein geringer Gehalt solcher Lösungen an Mononatriumphosphat hebt die alkalische Reaktion gegen Phenolphtaleïn auf, so dafs Mononatriumphosphatlösungen acidimetrisch mit Anwendung des genannten Indikators titriert werden können und man Dinatriumphosphat im Sinne der Mafsanalyse als nicht auf Phenolphtaleïn reagierend betrachtet).

Zu einer solchen Kaseïnkalklösung, welche rote Lackmustinktur blau färbte, Phenolphtaleïnlösung aber unverändert liefs, wurde nach Hinzufügung von etwas Phenolphtaleïn soviel Kalkwasser aus einer Bürette hinzugesetzt, bis die Lösung schwache, aber deutliche Alkalescenz gegen den genannten Indikator zeigte. In der eingedampften Flüssigkeit wurde nach Veraschen des Rückstandes auf 100 Teile angewandten Kaseïns 2,32 pCt. Calciumoxyd gefunden. Diese, oder richtiger gesagt, eine um ein geringes kleinere Menge Calciumoxyd verbindet sich mit dem Kaseïn zu einer auf Phenolphtaleïn wie ein neutrales Salz sich verhaltende Kaseïnkalkverbindung, welche jedoch gegen Lackmus sich wie eine alkalisch reagierende Substanz verhält. Dieselbe ist, wie schon erwähnt, mit jener zweifellos identisch, die durch Kochen von Kaseïn mit überschüssigem kohlensauren Kalk erhalten wird, wie aus dem gleichen Kalkgehalt beider Verbindungen: 2,39 und 2,32 Teilen Calciumoxyd auf 100 Teile Kaseïn, hervorgeht.

Zu einem gleichen Resultat hinsichtlich der Kalkmenge, welche das Kaseïn bis zur Bildung einer Phenolphtaleïn nicht verändernden Verbindung binden kann, gelangt man, wenn man Kaseïnkalklösungen, welche beliebige Mengen überschüssigen Kalkes enthalten, mit einer Mineralsäure von bekanntem Gehalt, in einer Probe unter Anwendung von Phenolphtaleïn und in einer zweiten unter Benutzung von Methylorange (Poiriers Orange III. Dimethylanilin-diazobenzolsulfosaures Ammon) titriert.

Die mit Phenolphtaleïn schwach rot gefärbte Lösung wird beim Hinzufügen der Säure zunächst farblos, wenn sich die schon genannte gegen Phenolphtalein indifferente, aber Lackmus bläuende Kaseïnkalkverbindung gebildet hat. Die mit Methylorange gelb

gefärbte Lösung wird durch die zugesetzte Mineralsäure rot gefärbt, wenn aller vorhandene freie und an Kasein gebundene Kalk, an die zugesetzte Säure gebunden und ein kleiner Überschufs von letzterer vorhanden ist.

In den vorliegenden Versuchen wurden zwei Kalkkaseïnlösungen von verschiedenem Kalkgehalt mit $^1/_{10}$ Normal-Schwefelsäure unter Anwendung der genannten Indikatoren titriert. Die der Kaseïnkalklösung zugesetzte Menge Methylorange (1 ccm einer 0,015 pCt. Lösung dieses Farbstoffes) verbrauchte zur Hervorbringung des Farbenumschlags 0,18 ccm der Schwefelsäure, welche Menge von der beim Titrieren verbrauchten in Abrechnung kam. Der Kaseïngehalt der Lösungen war aus dem Stickstoffgehalt derselben, bestimmt nach der Kjeldahlschen Methode, berechnet. Als Grundlage für diese Berechnung galt, dafs das Kaseïn 15,65 pCt. N. enthält. Es fand nämlich Hammarsten[1]) in dem nach seiner Methode dargestellten Kaseïn (2—8mal gefällt nach der Dumasschen Methode 15,56—15,72, im Mittel 15,65 pCt. Stickstoff. In zwei von mir nach der Kjeldahlschen Methode ausgeführten Stickstoffbestimmungen, mit einem 6mal gefällten Kaseïn, welches zum Zweck der Ermittelung seines Gehaltes an Phosphor dargestellt worden war, wurde erhalten 15,63—15,67 pCt., im Mittel 15,65 pCt. Stickstoff. Ritthausen[2]) fand in den durch Kupfersalz gefällten Gemengen der Milcheiweifsstoffe nach Dumas' Methode 15,3—15,7 pCt., im Mittel 15,5 pCt. Stickstoff.

$^1/_{10}$ Norm. SO_3 ccm verbraucht	Gesamt CaO in der Lösung Gramm	$^1/_{10}$ Norm SO_3 ccm verbraucht	Freies CaO	Kaseïngehalt der Lösung	Von Kaseïn gebundenes CaO	Auf 100 Teile Kaseïn treffen gebundenes CaO
16,10	0,045	8,10	0,0226	0,96	0,0234	2,43
34,65	0,097	21,00	0,059	1,64	0,038	3,34
					Mittel:	2,39

Die hier gefundenen Kalkmengen, von welchen angenommen werden mufs, dafs sie mit dem Kaseïn eine salzartige Verbindung

1) Zeitschrift für physiologische Chemie 7, 263.
2) Journ. f. prakt. Chemie N. F. 16, 237.

eingegangen sind, stimmen mit den in den früher mitgeteilten Resultaten erhaltenen Mengen 2,39 — 2,32, hier 2,39 pCt. gut überein.

Schliefslich wurde das Basenbindungsvermögen des Kaseïns durch Titrieren mit Natronlauge unter Anwendung von Phenolphtaleïn zu ermitteln gesucht. Derartige Versuche gelingen nur sicher, wenn man das staubfein-pulverige Kaseïn zuerst mit wenig Wasser zu einem gleichmäfsigen Schlamm verreibt, weitere entsprechende Mengen Wasser hinzufügt und die Natronlauge nur tropfenweise unter stetigem Umschütteln zufliefsen läfst. Feine Verteilung des Kaseïns beziehungsweise des Einhaltens der letzteren Bedingungen ist überhaupt bei allen Titrationsversuchen mit Kaseïn, resp. Kaseïnlösungen unerläfslich.

Gramm Kaseïn + 100 ccm Wasser	Verbraucht Kbkcentimeter $^1/_{10}$ Normal-Natronlauge	Gramm Na_2O	100 Kaseïn binden Na_2O
4,070	34,5	0,1069	2,62
4,930	41,0	0,1271	2,57
		Mittel:	2,59

Die gefundene Menge Natriumoxyd, welche mit dem Kaseïn eine gegen Phenolphtaleïn sich neutral verhaltende Verbindung eingehen kann, ist einer Calciumoxydmenge von 2,34 Teilen auf 100 Teilen Kaseïn äquivalent; durch frühere Versuche gefunden 2,39 — 2,32 — 2,39 Calciumoxyd.

Die hier mitgeteilten Versuchsergebnisse beweisen nicht, dafs das Kaseïn nicht mehr einer Base, als hier gefunden, zu binden vermag; sie beweisen nur, dafs eine Lackmus bläuende, Phenolphtaleïn aber nicht rötende Kaseïnverbindung existiert, welche die angegebenen Basenmengen enthält; denn auch das Lackmus bläuende, Phenolphtaleïn nicht rötende Dinatriumphosphat wird erst zu einer gesättigten Verbindung, wenn es noch ein Molekül Natrium aufgenommen hat, welche gesättigte Verbindung nun auch Phenolphtaleïn rötet und sich letzterem gegenüber, in seinen Lösungen, wie eine freies Alkali enthaltende Flüssigkeit verhält. Die Kuhmilch ist aber eine Phenolphtaleïn nicht rötende Flüssigkeit, der Käsestoff der Milch kann also nicht mehr Basen gebunden enthalten, als die hier auf verschiedene Weise dargestellten oder entstandenen Kaseïn-

verbindungen enthalten haben, d. h. die hier gefundenen Basenmengen — im Mittel 2,36 Teile Calciumoxyd auf 100 Teile Kaseïn — können im Maximo in der Milch an Kaseïn gebunden sein.

Neben der genannten Kaseïnverbindung, welche auf 100 Teile Kaseïn 2,36 Calciumoxyd oder eine äquivalente Menge Natrium- oder Kaliumoxyd enthält, läfst sich noch die Existenz einer Verbindung des Kaseïns mit einer bestimmten geringeren Basenmenge daraus schliefsen, dafs es Kaseïnverbindungen mit Calcium-, Kalium- oder Natriumoxyd giebt, welche nicht nur Phenolphtaleïn sondern auch den Lackmusfarbstoff unverändert lassen. Das Verhältnis von Base zu Kaseïn in dieser Verbindung wird zu ermitteln sein, wenn fein aufgeschlämmtes Kaseïn mit Lösungen der genannten Basen von bekanntem Gehalt unter Zuhilfenahme von Lackmus titriert werden, oder zweckmäfsiger, wenn Kaseïnlösungen mit einem überschüssigen Gehalt an genannten Basen mit so viel einer Mineralsäure von bekanntem Gehalt versetzt werden, bis wieder die Flüssigkeit schwach saure Reaktion zeigt. Der letztere Weg wurde hier eingeschlagen und eine filtrierte Kaseïnlösung verwendet, deren Kalk- und Kaseïngehalt (letzterer aus dem Stickstoff der Lösung) bestimmt war. 100 ccm einer solchen Lösung von wechselndem Gehalt an Kaseïnkalk und wechselnder Zusammensetzung letzterer Verbindung wurden mit $^1/_{10}$ Normal-Schwefelsäure titriert und zwar unter Anwendung von Phenolphtaleïn einerseits und Lackmus andererseits. Die Endreaktion konnte bei Anwendung von Lakmustinktur weniger deutlich, als bei Anwendung von sehr empfindlichem Lackmuspapier beobachtet werden und wurde deshalb letzterem resp. der Ausführung der Tüpfelmethode der Vorzug gegeben. Die gleichzeitig mit Phenolphtaleïn ausgeführten Parallelversuche liefern eine Bestätigung der früher erhaltenen Resultate nach etwas modifizierter Methode, insoferne Kaseïnkalklösungen mit analytisch bestimmtem Calciumoxydgehalt zur Anwendung kamen. Dieselben sind zur weiteren Ergänzung des Materials für die Beantwortung der bisher behandelten Frage und um dieselben den mit Lackmus ausgeführten Titrationsversuchen gegenüber zu stellen, hier angeführt.

Phenolphtaleïn als Indikator:

No.	Kaseïngehalt in 100 ccm: Gramm	Calciumoxydgehalt der Lösung Gramm	ccm $^1/_{10}$ Norm.-Schwefelsäure verbraucht	Der Schwefelsäure äquivalente Calc.-Oxydmenge Gramm	Calciumoxyd auf das Kaseïn treffend Gramm	Auf 100 Teile Kaseïn treffen Calciumoxyd
1	2,17	0,0634	5,22	0,0146	0,0488	2,25
2	3,00	0,1250	21,00	0,0588	0,0663	2,21
3	2,00	0,1560	38,20	0,1070	0,0490	2,40
4	0,96	0,0450	8,30	0,0230	0,0220	2,30
					Mittel:	2,29

Lackmus als Indikator:

No.	Kaseïngehalt in 100 ccm: Gramm	Calciumoxydgehalt der Lösung Gramm	ccm $^1/_{10}$ Norm.-Schwefelsäure verbraucht	Der Schwefelsäure äquivalente Calc.-Oxydmenge Gramm	Calciumoxyd auf das Kaseïn treffend Gramm	Auf 100 Teile Kaseïn treffen Calciumoxyd
1	2,17	0,0634	9,80	0,0274	0,0360	1,65
2	3,00	0,1250	29,50	0,0826	0,0424	1,41
3	2,00	0,1560	45,30	0,1268	0,0292	1,46
4	0,96	0,0450	10,20	0,0285	0,0165	1,71
					Mittel:	1,55

Aus den letzten Titrierungsversuchen mit Kaseïnkalklösungen, wobei Lackmus als Indikator verwendet wurde, ist zu entnehmen, — die geringe Menge der verbrauchten Säure, welche zur Hervorbringung der Endreaktion erforderlich war, kann aufser acht gelassen werden — dafs das Kaseïn mit Calciumoxyd eine gegen Lakmus sich neutral verhaltende Verbindung eingeht, in welcher auf 100 Teile Kaseïn im Mittel 1,55 Teile Calciumoxyd treffen. Ohne die Berechtigung einer zutreffenderen Benennung anzuzweifeln, sei aus Zweckmäfsigkeitsgründen hier diese Verbindung — 100 Teile Kaseïn, 1,55 Teile Calciumoxyd — im Hinblick auf ihr Verhalten zu Lackmus die „neutrale“ Kalk- (resp. Natron- oder Kali-) verbindung, die gegen Lackmus alkalisch, gegen Phenolphtaleïn indifferente Verbindung — 100 Teile Kaseïn, 2,36 Teile Calciumoxyd — die „basische“ Kalkverbindung des Kaseïns genannt.

Man kann mit dieser Bezeichnung dann die Vorstellung verknüpfen, dafs man Kaseïnkalk-, resp. Natron- oder Kalilösungen, welche weniger Basen enthalten und gegen Lackmus sauer reagieren, als Lösungen betrachtet, welche eine „saure“ Kaseïnkalk-, Natron- oder Kaliverbindung enthalten.

Gegen Lackmus alkalisch reagierende, Phenolphtaleïn nicht rötende Kaseïnkalklösungen, welche die basische Verbindung von 100 Teilen Kaseïn, 2,36 Teilen Calciumoxyd enthalten, sind opalisierende Flüssigkeiten. Neutral oder schwach sauer reagierende Kaseïnkalklösungen, enthaltend die Verbindung von 100 Teilen Kaseïn mit 1,55 Teilen Calciumoxyd, besitzen milchweifses Aussehen und sind nur in ganz dünnen Schichten durchscheinend.

Neutrale oder schwach saure Kaseïnkalklösungen, welche durch Verreiben der entsprechenden Menge Kaseïn und Kalk dargestellt worden sind, nehmen die milchig-trübe Beschaffenheit erst an, nachdem sie einige Zeit gestanden haben. Beim Neutralisieren resp. schwachen Ansäuern alkalischer Kaseïnkalklösungen mittelst einer Säure, welche ein lösliches Kalksalz bildet, tritt mit abnehmender Alkalescenz sofort eine Verringerung der Durchsichtigkeit ein, die mit erreichter Neutralität oder geringer Überschreitung der letzteren ihr Maximum erreicht. Alkalisch, neutral oder eben nur wahrnehmbar sauer reagierende Kaseïnkalklösungen gerinnen beim Kochen nicht, stärker saure Lösungen bei um so geringerer Temperatur-Erhöhung, je saurer sie sind.

Zu dem Ausgangspunkte unserer Erörterungen über das Basenbindungsvermögen des Kaseïns zurückkehrend, handelt es sich noch um die Frage, welche der Kaseïnverbindungen, ob die neutrale oder basische, in der Milch enthalten ist.

Für den vorliegenden Fall ist es belanglos, ob in der Milch eine Kaseïnkalk- oder Kaseïnnatron- oder -Kaliverbindung enthalten ist; es handelt sich hier um die von dem Kaseïn gebundene Basenmenge überhaupt; es sei aber doch schon hier darauf verwiesen, dafs man es in dem Kaseïn der Milch unzweifelhaft mit einer *Kaseïnkalkverbindung* zu thun hat, worauf später noch zurückgekommen werden wird.

Die basische Kaseïnkalkverbindung mit 2,36 Teilen Calciumoxyd auf 100 Teile Kaseïn reagiert auf Lackmus stark alkalisch und wird durch Labferment nicht zur Gerinnung gebracht; die

Milch reagiert amphoter und gerinnt durch Lab. Es ist dieses Gegensatzes wegen im höchsten Grade wahrscheinlich, dafs der Käsestoff der Milch als die neutrale Kalkverbindung des Kaseïns zu betrachten sei.

Um jedoch diese Frage nicht vorweg zu gunsten unserer Folgerungen zu entscheiden, soll in den beiden nun folgenden Aufstellungen einmal der Käsestoff der Milch als die „neutrale", das andere Mal als die „basische" Kaseïnkalkverbindung betrachtet werden.

Verteilung der Basen und Säuren auf Salze der Milch unter Berücksichtigung des Phosphorgehaltes und des Basenbindungsvermögen des Kaseïns; pro Liter Milch:

Bei Gegenwart der „neutralen" Kaseïnkalkverbindung:

	I.	II.
Chlornatrium	0,877	0,962
Chlorkalium	0,603	0,830
Trikaliumphosphat	1,653	0,903
Kaliumoxyd	0,405	0,595
Tricalciumphosphat	2,315	2,793
Trimagnesiumphosphat	0,447	0,436
Calciumoxyd am Kaseïn . . .	0,465	0,465

Bei Gegenwart der „basischen" Kaseïnkalkverbindung:

	I.	II.
Chlornatrium	0,877	0,962
Chlorkalium	0,603	0,830
Trikaliumphosphat	2,261	1,516
Kaliumoxyd	—	0,186
Tricalciumphosphat	1,867	2,347
Trimagnesiumphosphat	0,447	0,270
Calciumoxyd an Kaseïn . . .	0,708	0,708

Durch die Berücksichtigung der an das Kaseïn gebundenen Basen ändert sich das Verhältnis von Basen zu Säuren in den Milchsalzen nicht so wesentlich, dafs das Ergebnis der Berechnung ohne weiteres verständlich geworden wäre. Wenn auch die Möglichkeit zugegeben werden mufs, dafs das gesamte nicht an Kaseïn gebundene Calcium- und Magnesiumoxyd als Triphosphat in der Milch enthalten sein kann, so stimmt doch der über dies Verhältnis hinausgehende Basengehalt, welcher hier durch die Trikaliumphosphat- und Kaliumoxydmenge zum Ausdruck gebracht ist, nicht mit der Thatsache, dafs die Milch eine amphoter reagierende

Flüssigkeit ist, welche erst nach weiterer Basenaufnahme alkalische Reaktion gegen Lackmus oder alkalische Reaktion gegen Phenolphtaleïn zu zeigen vermag (Milch oder ein Gemisch von Mono- und Dinatriumphosphat reagiert nicht auf Phenolphtaleïn „alkalisch"; Rötung tritt erst ein, wenn durch Zufügen von Ätzalkalien Dinatriumphosphat allein oder eine kleine Menge Trikaliumphosphat gebildet wurde).

Letztere Erwägung drängt zu der Annahme, dafs noch andere Säuren, als die von uns bisher angeführten, in der Milch enthalten sein müssen und zwar neben Kohlensäure auch organische Säuren. Die Notwendigkeit einer solchen Annahme ergiebt sich noch viel dringlicher, wenn man das Verhältnis von Basen zu Säuren in dem eigentlichen Milchserum betrachtet und zwar in jenem, welches durch Filtration der Milch durch eine poröse Thonzelle erhalten wird. Diese zuerst von Zahn[1]) angewendete Methode liefert ohne chemische Veränderung und ohne Anwendung wasserentziehender Mittel, auf rein mechanischem Wege ein Filtrat, welches sämtliche gelöste Stoffe enthält, Fett, suspendierte Stoffe, sowie das mehr im Zustande einer dünnen Gallerte vorhandene Kaseïn aber nicht in das Filtrat gelangen läfst. Über die Ausführung dieser Filtration und über die ihr verwandte Methode, das Serum der Milch durch Thonplatten aufsaugen zu lassen, komme ich noch zurück.

Es enthielt 1 l ganze Milch und das einem Liter Milch entsprechende Serum an Aschenbestandteilen:

	Ganze Milch	Serum
Chlor	0,98	0,98
Phosphorsäure	1,82	0,96
Kaliumoxyd	1,72	1,73
Natriumoxyd	0,51	0,46
Calciumoxyd	1,98	0,80
Magnesiumoxyd	0,20	0,13

Hierzu ist zu bemerken, dafs um Vergleichswerte zu erhalten, die im Serum gefundenen Mengen auf 1 l Milch umgerechnet wurden und zwar auf Grund der Thatsache, dafs die Chloride der Milch als unzweifelhaft in Wasser lösliche Verbindungen im Serum gelöst und dem entsprechend im Thonzellenfiltrat in demselben Verhältnis zu gelösten anderen Stoffen enthalten sein müssen, wie

1) Pflügers Archiv f. Physiol. 1869, 598.

in der Milch selbst. Übrigens sind, da das Serumvolum von dem Milchvolum nur um einige Prozente verschieden ist, die Unterschiede zwischen berechneten und gefundenen Werten nur gering, meistens fallen sie innerhalb der Beobachtungsfehler. Das Kaliumoxyd der Milch findet sich vollständig im Serum, worauf noch zurückgegriffen werden wird. Die Menge des Natriumoxyds ist im Serum etwas geringer, als in der ganzen Milch, was weit mehr in den bei der Natriumbestimmung unvermeidlich gröfseren Beobachtungsfehlern, als in anderen Verhältnissen, zu suchen sein wird. In der nun folgenden Aufstellung, in welcher Säuren und Basen zu Salzen gruppiert sind, sind deshalb die in 1 l Milch enthaltenen Chlor-, Kalium- und Natriumoxydmengen als auch in dem Serum enthalten eingesetzt.

In dem Serum eines Liters Milch sind gelöst:

Chlornatrium	0,962
Chlorkalium	0,830
Dikaliumphosphat	2,223
Dimagnesiumphosphat . . .	0,096
Magnesiumoxyd	0,098
Calciumoxyd	0,800

Aus dieser Zusammenstellung ergiebt sich unzweifelhaft, dafs aufser den bekannten Säuren in der Milch noch Säuren enthalten sein müssen, deren Natur und Menge uns nicht bekannt ist; denn es ist unmöglich, dafs eine amphoter reagierende, klare Flüssigkeit neben Chloralkalien alkalisch reagierendes Dikaliumphosphat und Calciumoxyd in der angegebenen Menge enthält.

Die Gegenwart von Milchzuckerkalk, einer stark alkalischen und die Alkalinität freien Kalkes besitzende Verbindung ist ebensowenig möglich, als die Anwesenheit gelösten Calciumoxydes selbst.

Die in der Milch enthaltene Kohlensäure kann an der Sachlage, wie sie sich hier darstellt, wenig ändern.

Nach den Untersuchungen von Setschenow[1]) enthielt frische Kuhmilch unter einer Ölschicht gemolken 5,65, 6,72, 5,01 Vol. pCt. freie auspumpbare, aber keine gebundene Kohlensäure; Pflüger[2]) fand in auf andere Weise unter Luftabschlufs gemolkener Milch 7,60 und 7,40 Vol. pCt. freie Kohlensäure, in dem einen Falle

1) Zeitschr. f. rationelle Medizin v. Henle und Pfeiffer 1861, S. 265.
2) Archiv f. Physiologie 1869, II. Jahrg., 173.

keine, in dem anderen Falle 0,2 Vol. pCt. durch Phosphorsäure ausgetriebene Kohlensäure, in Gewichtsprozenten im Mittel 0,140 g Kohlensäure pro Liter. Der Umstand, dafs fast immer die ganze Menge der Kohlensäure sich aus der Milch auspumpen läfst, sowie die relativ geringe Menge, in welcher dieselbe in der Milch enthalten ist, kann uns der Kohlensäure eine besondere Bedeutung für die Lösungsverhältnisse der Salze in der Milch nicht beilegen lassen. Eine Lösung von Di-Natriumphosphat, in welche Kohlensäure eingeleitet wird, zeigt zwar nach Soxhlet[1]) amphotere Reaktion, diese wird aber nach dem Genannten in der Milch nicht durch die Kohlensäure im wesentlichen bedingt, da die Milch, wenn sie durch Auspumpen oder Kochen von ihrem Kohlensäuregehalt befreit ist, keine auffallende Änderung in der amphoteren Reaktion erkennen läfst.

Die Abwesenheit der Milchsäure in der frischen Milch ist von verschiedenen Seiten dargethan worden. Wir wissen auch jetzt, dafs dieses Zersetzungsprodukt des Milchzuckers erst einige Zeit nachdem die Milch das Euter verlassen hat, in dieser auftritt. In der Drüse ist die Milch, wie Lister für die Kuhmilch und Escherich für die Frauenmilch dargethan hat, keimfrei und nach den Untersuchungen von Soxhlet und Henkel[2]) geht der Milchsäurebildung in der Milch ein „Inkubationsstadium" voraus, in welchem die Acidität der Milch völlig unverändert bleibt, und welches für fast alle Temperaturen einen Zeitraum umfafst, der 40 pCt. von jenem beträgt, welcher zwischen dem Verlassen des Euters und dem Eintritt der freiwilligen Gerinnung liegt.

Die wichtigste Aufklärung über den in Rede stehenden Gegenstand liefert uns die im hiesigen Laboratorium von Th. Henkel[3]) gemachte Entdeckung, dafs die Kuhmilch als konstanten Bestandteil Citronensäure enthält.

Henkel fand, dafs beim Eindampfen eiweifsfreien Milchserums und bei Gegenwart entsprechender Mengen löslicher Kalksalze sich

---

1) Journal f. prakt. Chem. N. F. 6, S. 19.

2) Bericht über die Wanderversammlung bayerisch. Landwirte. München 1884.

3) Vorläufige Mitteilung hierüber durch Prof. Soxhlet in der Münchener Morph. Phys. Ges.; Bericht hierüber in der Münch. Med. Wochenschr. 1888, Nr. 19.

ein krystallinischer Niederschlag von citronensaurem Kalk abscheidet, welcher mit Schwefelsäure oder Oxalsäure zersetzt 0,8—1,2 g Citronensäure pro Liter Milch lieferte. Diese Citronensäure-Menge — durchschnittlich 1 g pro Liter — stellt nicht die ganze Menge dar, die in der Milch enthalten ist, sondern nur jenen Anteil derselben, der sich in der Form eines Kalksalzes unter den angegebenen Bedingungen ausscheidet. Bei dem derzeitigen Mangel einer analytischen Methode zur Bestimmung des Citronensäuregehaltes der Kuhmilch läfst sich dieser seinem wirklichen Werte nach als Faktor in unsere Rechnung nicht einsetzen.

In der folgenden Aufstellung wird von der Voraussetzung ausgegangen, dafs die im Milchserum als vorhanden sich berechnende Mengen Calcium- und Magnesiumoxyd an Citronensäure gebunden seien. Weiter wurde in derselben der Thatsache Rechnung getragen, dafs das Serum amphoter reagiert, und dafs 100 ccm Serum 3,2 ccm $^1/_4$ Normal-Natronlauge verbrauchen, um Phenolphtaleïn zu röten; dafs also eine dieser Alkalimenge äquivalente Menge Monokaliumphosphat im Serum enthalten sein mufs, welche das Vorhandensein einer entsprechenden Menge organischer Säure zur Voraussetzung hat; diese organische Säure wurde auch als Citronensäure berechnet (2,517 g pro Liter). Hiernach würde das Serum der Milch enthalten, resp. 1 l Milch an löslichen Salzen:

Chlornatrium	0,962	
Chlorkalium	0,830	
Dikaliumphosphat . . .	1,156	
Monokaliumphosphat . .	0,835	
Kaliumcitrat	0,495	(0,384 Citronens.)
Dimagnesiumphosphat .	0,096	
Magnesiumcitrat . . .	0,367	(0,313 Citronens.)
Calciumcitrat	2,133	(1,82 Citronens.)

Nach dieser Berechnung mufsten im Liter Milch 2,517 g Citronensäure enthalten sein, während Henkel aus dem angegebenen Milchquantum durchschnittlich 1 g dieser Säure präparativ gewinnen konnte. Jedenfalls ist mit der von Henkel gemachten Beobachtung der Nachweis geliefert, dafs in der Milch neben den uns bekannten Mineralsäuren, auch organische Säuren enthalten sind, welche bei der Betrachtung der Verhältnisse von Basen zu Säuren zunächst berücksichtigt werden müssen, bevor man zu einer komplizierten und schwer verständlichen Erklärung des anscheinend

vorhandenen Widerspruchs schreitet, der zwischen den thatsächlichen Lösungsverhältnissen und der angenommenen Zusammensetzung liegt. Nachdem einmal nachgewiesen ist, dafs eine organische Säure in relativ beträchtlicher Menge in der Milch vorhanden ist, braucht man wohl nicht auf die Erbringung des Beweises zu warten, dafs im Liter Milch anstatt der bisher präparativ gewonnenen Menge von 1 g Citronensäure die von 2,5 g enthalten sei, wie es unsere Rechnung verlangt; man wird vielmehr, ohne berechtigten Widerspruch herauszufordern, behaupten können, dafs der Gehalt des Milchserums an organischen Säuren das Zustandekommen von nur löslichen Milchsalzen im Serum bewirkt. Unter dieser Voraussetzung wären in unserem Beispiel, wie ausgeführt wurde, 2,5 g Citronensäure zur Bildung nur löslicher Salze und zum Zustandekommen einer amphoter reagierenden Lösung von angegebener Acidität erforderlich. Es ist selbstverständlich für unseren Fall gleichgültig, ob die organische Säure im Milchserum der ganzen Menge nach als Citronensäure vorhanden ist, oder ob neben der Citronensäure auch andere organische Säuren in der Milch enthalten sind; jedenfalls haben wir allen Grund, anzunehmen, dafs eine dem anscheinend ungedeckten Basenrest äquivalente Menge einer organischen Säure im Milchserum vorhanden ist, welcher der Menge von 2,5 g Citronensäure entspricht.

Die soeben mitgeteilten Untersuchungen über das Serum resp. Thonzellenfiltrat der Milch liefsen uns die Säuremenge kennen lernen, welche wir bei der Schlufsbetrachtung über das Verhältnis von Säuren und Basen in der Gesamtmilch einzusetzen haben, vor deren Ausführung die bisher noch nicht endgültig entschiedene Frage zu beantworten versucht werden soll, ob der Käsestoff in der Milch, als die neutrale oder basische Verbindung des Kaseïns mit Calciumoxyd zu betrachten ist. Es wurde an früherer Stelle darauf hingewiesen, dafs man es höchst wahrscheinlicherweise in der Milch mit der „neutralen“ Kaseïnkalkverbindung zu thun habe, weil: 1. Die basische Verbindung gegen Lackmus stark alkalisch, die Milch aber amphoter reagiert. 2. Weil eine Kaseïnlösung, welche nur die basische Verbindung enthält und gegen Phenolphtaleïn nicht reagiert nach Zusatz einer minimalen Menge eines Alkalis Phenolphtaleïn rötet; die Milch hingegen braucht, um gegen Phenolphtaleïn alkalische Reaktion zu zeigen, noch eine verhältnis-

mäfsig beträchtliche Menge an Alkali, und zwar 100 ccm durchschnittlich 7 ccm $^1/_4$ Normal-Natronlauge. 3. Weil die basische Kaseïnkalkverbindung durch Lab nicht zur Gerinnung gebracht wird, während die neutrale Verbindung ebenso wie die Milch durch Lab koaguliert wird.

Einen weiteren Anhaltspunkt dafür, dafs in der Milch die neutrale Kaseïnkalkverbindung enthalten ist, ergiebt sich aus der Betrachtung des Verhältnisses der Acidität ganzer Milch zu der Acidität des Thonzellenfiltrates, des Milchserums.

Bestimmt man die durch saure Phosphate bedingte Acidität, der Milch nach der Methode Soxhlet und Henkel (50 ccm Milch werden unter Zusatz von 2 ccm einer alkoholischen 2prozentigen Phenolphtaleïnlösung mit $^1/_4$ Normal-Natronlauge titriert, wobei als Endreaktion das Auftreten einer eben bemerkbaren Rötlichfärbung der Flüssigkeit zu betrachten ist; die Anzahl der verbrauchten Kubikcentimeter dient als Ausdruck für die Acidität, so findet man, dafs 100 ccm Milch in der Regel 7 ccm $^1/_4$ Normal-Natronlauge zur „Neutralisation“ erfordern. Diese Acidität zeigte auch die Milch I. Die Acidität des Thonzellenserums ist in der Regel nur halb so grofs. 100 ccm Thonzellenfiltrat der Milch I verbrauchten zur Neutralisation unter denselben Verhältnissen, wie bei der Titrierung der Milch, 3,2 ccm $^1/_4$ Normal-Natronlauge. Die Differenz beträgt 3,8 ccm, welche nur von dem nicht filtrierbaren Kaseïn gebunden worden sein können. (Das Fett der Milch spielt hierbei keine Rolle, da bei durch Centrifugieren möglichst entfetteter Milch sich dasselbe Verhältnis zeigt.) 3,8 ccm $^1/_4$ Normal-Natronlauge entsprechen 0,0266 g Calciumoxyd. 3 g Kaseïn in 100 ccm Milch enthalten als basische Verbindung, wie aus den früher mitgeteilten Versuchen hervorgeht, 0,0717 g Calciumoxyd, als neutrale Verbindung 0,0465 Calciumoxyd; Differenz 0,0252, welch' letztere Menge Calciumoxyd also zur Überführung von 3 g der neutralen Verbindung in die basische erforderlich ist in Wirklichkeit wurden 0,0266 g verbraucht. Dieses Versuchsergebnis mufs im Zusammenhalte mit den unter 1, 2, 3 hervorgehobenen als eine genügende Fundierung der gemachten Annahme betrachtet werden, nach welcher der Käsestoff der Milch als die „neutrale“ Verbindung des Eiweifsstoffes: Kaseïn mit einer Base zu betrachten ist.

Wir gelangen nun zur Aufstellung unserer Schlufsrechnung über die Gruppierung der Basen und Säuren der Milch zu Salzen, bei welcher Aufstellung folgende Umstände berücksichtigt wurden:

1. dafs nicht die ganze Menge der Phosphorsäure der Milchasche als solche in der Milch enthalten ist, dafs vielmehr 25 pCt. derselben dem Phosphor des Kaseïns entstammen;

2. dafs das Kaseïn als Säure zu betrachten ist, welche ein bestimmtes Basenbindungsvermögen besitzt;

3. dafs der Käsestoff der Milch als die *neutrale Verbindung* des Eiweifsstoffes *Kaseïn mit* einer Base — *Calciumoxyd* — aufzufassen ist, in welcher Verbindung auf 100 Teile Kaseïn 1,55 Teile Calciumoxyd treffen.

4. Dafs die Milch eine amphoter reagierende Flüssigkeit ist.

5. Dafs die Milch noch Basen aufzunehmen vermag, um eine Phenolphtalcïn rötende Flüssigkeit zu bilden, und dafs die Phenolphtaleïn gegenüber vorhandene Acidität der Milch teils durch die Gegenwart saurer Phosphate (amphotere Reaktion), teils durch die Fähigkeit des Kaseïns bedingt wird, noch Basen aufzunehmen, ohne in eine, Phenolphtaleïn färbende, Verbindung überzugehen. Die Menge der sauren Phosphate in der Milch ergiebt sich aus der Differenz der Acidität der Milch und des Thonzellenfiltrates, welche Aciditätsdifferenz hier durch eine bestimmte Menge — 0,384 g — Citronensäure (s. o.) zum Ausdruck gebracht wird.

6. Dafs in der Milch bisher unbeachtet gebliebene, organische Säuren vorhanden sind, wie Henkel durch die Entdeckung der Citronensäure in der Kuhmilch mit Sicherheit nachgewiesen hat. Die Menge solcher organischen Säuren berechnet sich aus dem ungedeckten Basenrest des Thonzellenfiltrates, in unserem Falle zu 2,5 g Citronensäure (etwa doppelt so viel als Henkel präparativ aus Kuhmilch gewinnen konnte).

In einem Liter Milch sind nach Aschenanalyse II, auf welche sich auch die Analyse des Thonzellenfiltrates, sowie die sonstigen hier angeführten Untersuchungen zunächst beziehen, enthalten:

Chlornatrium	0,962
Chlorkalium	0,830
Monokaliumphosphat	1,156
Dikaliumphosphat	0,835

Kaliumcitrat	0,495
Dimagnesiumphosphat	0,336
Magnesiumcitrat	0,367
Dicalciumphosphat	0,671
Tricalciumphosphat	0,806
Calciumcitrat	2,133
Calciumoxyd an Kaseïn	0,465

Die bemerkenswertesten Zahlen in dieser Aufstellung sind diejenigen, welche sich auf das Vorkommen von Di- und Tricalciumphosphat in der Milch beziehen. Bei Würdigung derselben dürfen wir jedoch nicht vergessen, dafs das Calciumphosphat hier deshalb als in Wasser unlösliches Di- oder Triphosphat erscheint, weil die Menge der in der Milch vorhandenen organischen Säuren (als Citronensäure berechnet) nur nach dem ungedeckten Basenrest des Serums berechnet wurde. Das Vorhandensein einer gröfseren Menge solcher Säuren anzunehmen, so dafs auch das Kalkphosphat als wasserlösliche Verbindung erschiene, wäre indes unzulässig, weil:

1. Nicht die ganze Menge des Calciumoxydes abzüglich jener, die an Kaseïn gebunden ist, und nicht die ganze Menge der Phosphorsäure der Milch im Serum resp. Thonzellenfiltrat vorhanden ist. Wäre die ganze Menge des Calciumoxydes und der Phosphorsäure als wasserlösliche Verbindung und in der Milch gelöst vorhanden, nämlich als Monocalciumphosphat und Calciumcitrat, so müfsten Calciumoxyd und Phosphorsäure der Milch ebenso wie dieses bezüglich der Chloralkalien thatsächlich stattfindet, ihrer ganzen Menge nach im Thonzellenfiltrate gefunden werden, was jedoch nicht der Fall ist.

Von der Phosphorsäure der Gesamtmilch[1]) mit 1,819 g pro Liter sind in der entsprechenden Menge Serum 0,96 g = 52,2 pCt. enthalten; 0,859 g = 47,8 pCt. finden sich in dem nicht filtrierbaren Anteile der Milch.

Von dem Gesamtcalciumoxyd der Milch sind 0,465 g an Kaseïn gebunden 1,515 g in Form von Salzen in der Milch enthalten, davon im Thonzellenfiltrat 0,800 g = 52,8 pCt.; 0,715 g = 47,2 pCt. finden sich nicht im Milchserum.

1) Nicht Phosphorsäure der Asche, sondern letztere minus der aus dem Phosphor des Kaseïns entstandenen Phosphorsäure.

2. Würde ein dem Di- und Tricalciumphosphat der letzten Aufstellung entsprechende Menge wasserlösliches Monocalciumphosphat und Calciumcitrat (oder ein anderes neutrales lösliches organisches Kalksalz) in der Milch vorhanden sein, so würde die Acidität der Milch eine viel höhere sein als in Wirklichkeit der Fall ist.

Das Erscheinen von Di- und Tricalciumphosphat in unserer Aufstellung ist also mehr oder minder nur ein anderer Ausdruck für die Thatsache, die sich aus der Gegenüberstellung von Milchasche und Serumasche ergeben hat: nämlich, dafs etwa die Hälfte der in der Milch vorhandenen Phosphorsäure (als solche vorhanden) und etwa die Hälfte des Calciumoxydes (nach Abzug der an dem Kaseïn gebundenen Menge) nicht gelöst im Serum enthalten ist. Dieses Versuchsergebnis kann in der einfachsten und ungezwungensten Weise durch die Annahme gedeutet werden, dafs Di- und Tricalciumphosphat in der Milch suspendiert sind.

E. Duclaux [1]) gelangte in einer 1884 publizierten Arbeit ebenfalls zu dem Schlufs, dafs in der Milch Kalkphosphat suspendiert sei. Er bestimmte den Kalkphosphatgehalt in der Milch und im Serum, welch letzteres er durch Filtrieren der Milch durch ungebrannte Thonröhren (tubes porzellaine) erhielt. Duclaux läfst aber den Phosphor- und Kalkgehalt des Kaseïns, sowie den Umstand, dafs 100 ccm Milch und 100 ccm Serum nicht ohne weiteres vergleichbar sind, unberücksichtigt; derselbe teilt auch nicht die Phosphorsäure und Kalkmengen gesondert mit, sondern führt die Mengen von Calciumphosphat (Phosphate de Chaux) an, welche einerseits in 100 ccm Milch und andererseits in 100 ccm Serum enthalten sind. Er fand in 100 ccm Milch:

in „Suspension“: 0,22—0,21—0,18—0,23—0,22 g Calciumphosphat
in „Lösung“: 0,14—0,14—0,22—0,17—0,17 „ „

Es würde die angegebene Deutungsweise der Verteilung von Phosphorsäure und Kalk auf Gesamtmilch und Serum kaum auf Widerspruch stofsen, wenn nicht schon andere Anschauungen seither Vertretung gefunden hätten, und wenn den Kalkphosphaten nicht schon andere bestimmte Beziehungen zum Käsestoff der Milch zugeschrieben worden wären.

---

1) Deuxième mémoire sur le lait; Extrait des Annales de l'institut national agronomique, Tome VIII, 1883.

Hammarsten [1]) schreibt dem Kaseïn die Fähigkeit zu, Calciumkarbonat und Calciumphosphat in Lösung zu halten, er bezeichnet das Kaseïn als die Calciumphosphat lösende Substanz der Milch. Ob die Lösung durch Zustandekommen einer chemischen Verbindung zwischen Kaseïn und Calciumphosphat herrühre, konnte Hammarsten nicht bestimmt beantworten; er ist jedoch mehr zu der Annahme geneigt, dafs das Calciumphosphat durch das Kaseïn einfach gelöst sei. Hammarsten spricht weiter die Meinung aus, dafs die weifse Farbe der Milch nicht nur von dem Fett, sondern auch von dem in irgend einer Weise gelösten Calciumphosphat herrühre. — Diese Auffassungen Hammarstens über die Beziehungen des Calciumphosphates zum Kaseïn lassen für die Unfiltrierbarkeit eines Teils der Phosphorsäure und des Calciumoxydes der Milch auch eine andere Deutungsweise als die zu, dafs der unfiltrierbare Anteil der genannten Verbindung als unlösliche Kalkverbindung in der Milch suspendiert sei. Ist an und für sich in Wasser unlösliches Di- oder Tricalciumphosphat in irgend einer Weise durch das Kasein gelöst, und ist das Gelöstsein dieser Körper an die Gegenwart des Kaseïns gebunden, so kann, wenn durch die poröse Filterwand das Kaseïn als Lösungsmittel nicht hindurchgeht, auch das Gelöste, das Calciumphosphat die Filterwand nicht passieren; Di- und Tricalciumphosphat kann eben für sich, getrennt von seinem Lösungsmittel Kaseïn, nicht gelöst existieren.

Eine ebenso zulässige und noch bestimmtere Deutungsweise für die Unfiltrierbarkeit eines Teils des Calciumoxydes und der Phosphorsäure der Milch würde die Anschauung Euglings [2]) bieten, nach welcher der Käsestoff der Milch als eine chemische Verbindung von Kaseïn mit Tricalciumphosphat als „Kaseïntricalciumphosphat" zu betrachten ist. Die Theorie Euglings über die Natur des Kaseïns beruht aber, wie gezeigt werden wird, auf unrichtigen Voraussetzungen.

Während Hammarsten auf Grund seines aufserordentlich umfangreichen Beobachtungsmaterials über diesen Gegenstand, zu einer sehr reserviert gehaltenen Schlufsfolgerung gelangt, erklärt Eugling, dafs man aus der von ihm gemachten Beobachtung, nach welcher

1) Jahresber. f. Tierchemie, 1874, S. 135.
2) Landw. Vers.-Stat. XXXI, S. 391.

der durch Alkohol oder Kochsalz aus der Milch abgeschiedene Käsestoff Calciumoxyd und Phosphorsäure in demselben Verhältnis enthält, wie Tricalciumphosphat „annehmen müsse, dafs das in der ausgeschiedenen Käsemasse enthaltene Calcium als Triphosphat präformiert enthalten sei und dafs man somit die Berechtigung habe, den Käsestoff frischer Milch als Kaseïncalciumphosphat anzusehen". Die Theorie Euglings leidet an zwei Fehlern: 1. Ist die Schlufsfolgerung eine unrichtige, dafs eine organische Substanz, welche aus einer Lösung durch Fällung als Niederschlag erhalten wird, und präformiertes Tricalciumphosphat enthält, ohne weiteres als die chemische Verbindung der organischen Substanz mit Tricalciumphosphat angesehen werden mufs. 2. Ist die Voraussetzung unrichtig, dafs in den von Eugling analysierten Käsestofffällungen Tricalciumphosphat präformiert enthalten war.

Eugling betrachtet die in der Asche des Käsestoffs gefundene Phosphorsäure als „präformiert", während doch ein grofser Teil derselben aus dem Phosphor des Kaseïns erst bei der Veraschung entstanden war. Ebensowenig wie es angängig wäre, den Schwefel des Kaseïns in Form präformierter Schwefelsäure anzunehmen, weil man Schwefelsäure in der Asche des Käsestoffes findet und die Kaseïnkalkverbindung als „Kaseïncalciumsulfat" zu betrachten, ebensowenig kann es gestattet sein, den als Elementarbestandteil des Kaseïns vorhandenen Phosphor als präformiertem Calciumphosphat angehörig zu erklären. Rechnet man aber jenen Anteil der Phosphorsäure der Asche ab, welcher erst durch Veraschung aus dem Phosphor des Kaseïns entstanden ist, so verschwindet das ganz zufällige Verhältnis von Calciumoxyd zu Phosphorsäure, welches zu den irrigen Vorstellungen Anlafs gegeben hat, wie folgende Korrektur der Rechnung Euglings zeigt: Kaseïn durch Kochsalz aus der Milch ausgeschieden enthielt 0,1332 g Calciumoxyd und 0,1123 g Phosphorsäure. Verhältnis von Calciumoxyd zu Phosphorsäure wie 118,66 : 100. Verhältnis im Tricalciumphosphat 118,3 : 100. Die ausgeschiedene Kaseïnmenge kann nicht viel mehr oder weniger als 2,5 — 3 g betragen haben, welche 0,021 resp. 0,025 g Phosphor enthielten und bei der Veraschung 0,0485 resp. 0,058 g Phosphorsäure liefern mufsten; etwas mehr als die Hälfte der in der Asche des Niederschlags gefundenen Phosphorsäure; in dem gefällten Käsestoff konnten also nur 0,054 resp. 0,0638 *g*

präformierte Phosphorsäure enthalten sein; war dieselbe an den im Niederschlag gefundenen Kalk gebunden, so müssen wir, um mit Eugling zu reden, das in der Käsemasse enthaltene Calciumoxyd als Penta- resp. Hexacalciumphosphat „präformiert“ annehmen; denn auf 1 Mol. Phosphorsäure kommen annährend 5 resp. 6 Mol. Calciumoxyd; gefunden auf 100 Phosphorsäure 209 resp. 246, berechnet 197 resp. 236 Calciumoxyd.

Hierzu mufs bemerkt werden, dafs bei der Veraschung von Kaseïn, welches durch Kochsalz-, Alkohol- oder Labfällung oder mittelst Separation durch Thonplatten, aus frischer ungesäuerter Milch erhalten wird, aller Phosphor des Kaseïns als Phosphorsäure in der Asche gefunden wird, da die genannten Niederschläge genug Basen enthalten, um alle präformiert vorhandene und aus Phosphor neu entstehende Phosphorsäure als Biphosphat zu binden. Man erhält daher auch bei der Veraschung der reinsten Kaseïnkalkverbindungen, welche gar keine Phosphorsäure, sondern nur Phosphor als Elementarbestandteile des Kaseïns enthalten, allen Phosphor als Phosphorsäure resp. eine Asche, welche aus Dicalciumphosphat (resp. Pyrophosphat) oder Tricalciumphosphat besteht, und zwar genügt die Kalkmenge der neutralen Kalkkaseïnverbindung, um allen Phosphor des Kaseïns in der Form von 3,762 Dicalciumphosphat und die der basischen Verbindung um allen Phosphor in der Form von 4,35 pCt. Tricalciumphosphat in der Asche erscheinen zu lassen.

Die Gegenüberstellung der in der ganzen Milch und im Milchserum (Thonzellenfiltrat) vorhandenen Mineralstoffe sei hier nochmals angeführt, nebst Angabe des in der Milch Gelösten und Ungelösten in Gramm pro Liter und nach dem prozentischen Verhältnis:

	Ganze Milch	Serum „Gelöst“	pCt.	Differenz zwischen ganzer Milch u. Serum „Ungelöst“	pCt.
	g	g		g	
Chlor	0,98	0,98	100	0	0
Gesamt-Phosphorsäure in der Asche	2,40	—	—	—	—
Phosphorsäure nach Abzug der aus dem Kaseïn entstandenen Menge	1.82	0,96	52,7	0,86	47,3
Kaliumoxyd	1,72	1,73	100	—	0
Natriumoxyd	0.51	0,46	90,2	0,05?	9,8
Gesamt-Calciumoxyd	1,98	0,80	40,4	1,18	59,6
Magnesiumoxyd	0,20	0,13	65.0	0,07	35,0

Die schon an früherer Stelle hervorgehobene Thatsache, dafs die ganze Menge des Kalis in dem Thonzellenfiltrat gefunden wird, giebt Anlafs hier darauf hinzuweisen, dafs dieser Befund als der einzige direkte und noch von keiner Seite erbrachte Beweis dafür zu gelten habe, dafs der Käsestoff der Milch nicht als die Verbindung eines Eiweifskörpers (oder des Kaseïns) mit Kaliumoxyd zu betrachten sei.[1]) Dasselbe gilt wohl auch hinsichtlich des Natrons; die Differenz zwischen dem Natrongehalt der Milch und dem des Serums fällt innerhalb der Beobachtungsfehler, und die ungelöste Natronmenge reicht bei weitem nicht hin, um mit dem Käsestoff der Milch eine lösliche Verbindung zu bilden; denn in den Versuchen über das Basenbindungsvermögen des Kaseïns wurde gefunden, dafs 100 Teile Kaseïn 1,55 Calciumoxyd entsprechend 1,71 Natriumoxyd oder 2,60 Kaliumoxyd zu binden vermögen, wobei sich die gegen Lackmus neutral reagierende, durch Lab fällbare Verbindung bildet (die basische Verbindung braucht 2,36 Calciumoxyd = 2,61 Natriumoxyd = 3,96 Kaliumoxyd). Bei einem Kaseïngehalt von 3 pCt. würden zur Bildung der neutralen (basenärmeren) Verbindung pro Liter Milch erforderlich 0,513 *g* Natriumoxyd, während als „gelöst" in der Milch 0,050 *g* gefunden wurden.

Zu einem gleichen Resultat führte ein Versuch, in welchem das Serum der Milch von einer porösen Thonplatte aufgesogen wurde und der zurückbleibende unlösliche Teil der Milch, sowie die Milch selbst zur Untersuchung gelangte.

	Es enthielt die Milch pro Liter	Der Plattenrückstand von einem Liter, serumfrei gedacht	
Cl	0,82	—	— pCt.
K_2O	1,88	0,12	6,4 „
Na_2O	0,46	0,02	4,3 „

Die „ungelöste" Menge Kaliumoxyd beträgt pro Liter 0,12 *g*, die des Natriumoxydes 0,02 *g*,

die von 30 *g* Kaseïn pro Liter erforderliche Menge 0,78 *g* Kaliumoxyd oder 0,51 *g* Natriumoxyd.

1) Die von Eugling (Landw. Vers.-Stat. 31, S. 395) ohne Zahlenanführung gemachte Angabe: „denn schon eine mit gleichem Volumen Alkohol vermischte Milch zeigt nach einfachem Abpressen nicht mehr Alkalisalze, als *etwa* dem Feuchtigkeitsgehalte derselben auf Serum berechnet beträgt" kann unmöglich als eine „Widerlegung" der gegenteiligen Anschauung hingenommen werden, wie Eugling und auch F. Schaffer (Landw. Jahrb. d. Schweiz 1887) zu vermeinen glauben.

Auch die im unfiltrierbaren Rückstand vorhandene Magnesia reicht bei weitem nicht aus, um die Magnesia als diejenige Base zu erklären, welche mit dem Kaseïn in der Milch als salzartige Verbindung vorhanden ist. Die der basischen Kaseïnkalkverbindung entsprechende basische Magnesiaverbindung würde auf 100 Teile Kaseïn 1,68 und die neutrale 1,10 Teile Magnesia enthalten. Bei einem Kaseïngehalt von 3 pCt. müfsten im Liter Milch bei Anwesenheit der neutralen (magnesiaärmern) Verbindung 0,333 g Magnesiumoxyd sich im unfiltrierbaren Anteil befinden, während die Milch in unserem Fall pro Liter 0,07 g „ungelöste“ und überhaupt nur 0,20 g Gesamtmagnesia enthält.

Es kann also nur das Calciumoxyd, welches in gröfserer Menge sich im unfiltrierbaren Teile findet, als zur Bildung einer neutralen oder sogar basischen Kaseïnkalkverbindung notwendig ist, jene Base sein, welche mit dem Kaseïn sich in salzartiger Verbindung in der Milch befindet.

Weitere Betrachtungen über die gelösten und ungelösten Mengen der Phosphorsäure und des Calciumoxydes sollen an die in folgendem mitgeteilten Ergebnisse von Versuchen geknüpft werden, bei welchen zum gröfsten Teil auch Kaseïn- resp. N-bestimmungen ausgeführt wurden; aus letzteren wurde das Kaseïn nach dessen Stickstoffgehalt (15,65 pCt.) berechnet und von der berechneten Menge 0,4 g pro 100 ccm Milch als den gelösten Eiweifskörpern der Thonzellenfiltrate — Serum — angehörig abgerechnet. In einzelnen Versuchen wurde die Menge an gelösten Calciumoxyd und Phosphorsäure durch Analyse der Thonzellenfiltrate bestimmt.

Als eine Methode, um ohne chemische Veränderung oder Anwendung wasserentziehender Mittel ein Kaseïn- und fettfreies Milchserum zu erhalten, hat, wie schon angeführt, zuerst Zahn[1]) das Filtrieren der Milch durch eine poröse Thonzelle unter Zuhilfenahme der Luftleere angewendet. Die Ausführung solcher Filtrationen geschieht am zweckmäfsigsten in der Weise, wie sie Soxhlet[2]) beschrieben. Die in der Milch eingetauchte Thonzelle — wie solche als poröse Scheidewand in galvanischen Elementen verwen-

1) Pflügers Archiv für Physiol. 1869, S. 598.
2) Journ. f. prakt. Chem. 1872, N. F. S. 6, 39.

det werden — wird mit einer weichen, glatten, durchbohrten Gummiplatte und dickwandigen durchbohrten Glasplatte bedeckt, welche mittelst Kautschukstöpsel und Glasröhre mit der Wasserluftpumpe in Verbindung ist; Glas- und Gummiplatte werden durch den Luftdruck auf den abgeschliffenen Rand der Thonzelle luftdicht aufgepreſst. Die verwendeten Thonzellen (circa 20 cm hoch, 6,7 cm weit, 0,3 cm Wandstärke) wurden vor dem Gebrauch in der Weise gereinigt, daſs zunächst heiſse, verdünnte Kalilauge, dann heiſses destilliertes Wasser, dann heiſse verdünnte Salzsäure und schlieſslich heiſses destilliertes Wasser durch dieselben mittelst Luftdruck hindurch gesogen wurde; letzteres so lange, bis das Waschwasser chlorfrei war. Zu den Versuchen wurde immer frisch gemolkene Milch verwendet und die Filtrationszeit nie über 8 Stunden ausgedehnt, während welcher Zeit sich bei gewöhnlicher Temperatur keine Spur Milchsäure zu bilden vermag.

Die betreffenden Versuche sind mit Z bezeichnet; in anderen wurde das Serum der Milch von porösen Thonplatten aufgesogen und die Menge der ungelösten Phosphorsäure und die des Calciumoxydes in dem Plattenrückstande bestimmt. In beiden Fällen wurde auf Grund von Chlorbestimmungen die gelösten resp. ungelösten Phosphorsäure- und Calciumoxydmengen auf 1 l Milch reduziert. Zu den Aufsaugungsversuchen wurden Thonplatten mit etwas konkaver Oberfläche von 15 cm im Quadrat und 3 cm Dicke benutzt. Dieselben wurden vor ihrer Benutzung in ähnlicher Weise wie die Thonzellen gereinigt und nach der letzten Behandlung mit Salzsäure so lange in oft gewechseltes destilliertes Wasser eingestellt, bis letzteres nach mehrstündigem Stehen keine Chlorreaktion mehr zeigte. Auf jede Platte konnten 100 ccm auf einmal aufgegossen werden. Der nach beendigter Aufsaugung noch feuchte Rückstand — während der Aufsaugung war die Platte mit einer Glasglocke bedeckt — wurde nach der von Jul. Lehmann angegebenen Weise mittelst eines Hartgummispatels abgelöst. Überhaupt wurde bei Ausführung der Plattenversuche nach der von Jul. Lehmann[1]) hiefür ausgebildeten Technik verfahren. Die Temperatur in dem Raume, in welchem die Plattenversuche vorgenommen wurden, stieg nicht über 17° C. Nach längstens

1) Ann. d. Chem. 189, S. 358.

12 Stunden waren die Plattenrückstände gut abnehmbar. Der Wassergehalt derselben schwankte zwischen 15—20 pCt.

No.	In der Milch					Löslich = im Serum enthalten				Unlöslich = nicht filtrierbar				Abzügl. der vom Kaseïn gebundenen Menge	Im Ungelösten treffen auf 100 Phosphorsäure (l), Calciumoxyd (p)
	Kaseïn in g	Phosphorsäure		Calciumoxyd		Phosphorsäure		Calciumoxyd		Phosphorsäure		Calciumoxyd			
		in der Asche gefunden	nach Abzug der aus dem Phosphor des Kaseïns entstandenen Menge	Gesamtmenge	nach Abzug der von dem Kaseïn gebundenen Menge	g	in Prozent der Gesamtmenge	g	in Prozent der Gesamtmenge	g	in Prozent der Gesamtmenge	g	in Prozent der Gesamtmenge	g	
a	b	c	d	e	f	g	h	i	k	l	m	n	o	p	
1 Z	26,4	2,14	1,63	1,78	1,37	0,77	47,2	0,72	40,4	0,86	52,7	1,06	59,5	0,665	77,3
2 „	30,0	2,25	1,67	1,86	1,39	0,73	43,7	0,62	33,3	0,94	56,2	1,22	65,5	0,766	89,3
3 „	30,5	2,33	1,75	1,76	1,288	0,85	49,2	0,55	31,2	0,90	50,8	1,21	68,7	0,75	82,0
4 „	31,0	2,05	1,449	1,57	1,09	0,93	64,1	0,71	45,2	0,52	35,8	0,86	54,7	0,38	73.2
5 „	28,5	2,189	1,64	1,77	1,331	0,749	45,6	0,489	27,6	0,891	54,3	1,28	72,3	0,842	94,5
6 P	26,0	2,21	1,707	1,78	1,377	1,01	59,1	0,84	47,1	0,697	40,83	0,94	52,8	0,550	77,0
7 „	25,1	2,53	2,03	1,57	1,18	1,30	64,0	0,61	38,8	0,73	35,9	0,96	61,1	0,626	85,7
8 „	23,0	2,03	1,59	1,65	1,294	0,92	57,9	0,77	46,6	0,67	42,1	0,88	53,3	0,655	97,7
9 „	27,6	2,36	1,825	1,77	1,343	1,04	56,1	0,62	35,1	0,785	43,9	1,15	64,9	0,723	92,1
10 „	26,1	2,22	1,714	1,65	1,246	1,01	59,0	0,51	30,9	0,704	41,0	1,14	69,0	0,736	104,5

Aus vorstehender tabellarischer Zusammenstellung ergiebt sich:

Dafs 36—56 pCt. der in der Milch enthaltenen Phosphorsäure und 53—72 pCt. des in der Milch enthaltenen Calciumoxyds nicht im Serum gelöst sind, sondern jenen Bestandteilen der Milch angehören, welche in letzterer suspendiert oder in einem besonderen kolloiden, nicht filtrationsfähigen Zustande vorhanden sind. Ein Teil des nicht im Serum erscheinenden Calciumoxydes ist unzweifelhaft an das nicht filtrierbare Kaseïn der Milch gebunden. Der Rest des nicht filtrierbaren, aber nicht an Kaseïn gebundenen, Calciumoxydes ist an der gleichfalls sich im unfiltrierbaren Anteil vorfindenden Phosphorsäure gebunden. In diesem in der Milch enthaltenen unfiltrierbaren phosphorsauren Kalk treffen auf 100 Phosphorsäure 73—104 Teile Calciumoxyd, während im Dicalciumphosphat auf 100 Teile Phosphorsäure 78,8 und im Tricalciumphosphat 118,3 Teile Calciumoxyd kommen. Die in der Milch enthaltene, unfiltrierbare Verbindung des Calciumoxyds mit Phosphorsäure ist sonach als Dicalciumphosphat resp. als ein Gemenge von Di- und Tricalciumphosphat zu betrachten.

Wenn die angegebene Menge unfiltrierbaren, phosphorsauren Kalkes als suspendierte unlösliche Verbindung in der Milch enthalten ist, so mufs sich derselbe in allen jenen Kaseïngerinnseln befinden, welche ohne gleichzeitige Lösung des Kalkphosphates entstanden sind; in allen Fällen also, in welchen das Kaseïn nicht durch Säuren zur Gerinnung gebracht wurde: im Labkoagulum, in dem durch Neutralsalze infolge Wasserentziehung „ausgesalzenen" Käsestoff, in dem nach gleichem Prinzipe durch Alkohol gefällten Kaseïn; und zwar aus ganz demselben Grunde und in derselben Weise, wie das in der Milch suspendierte Fett fast quantitativ von dem Käsestoffgerinnsel eingeschlossen wird. Es kann also die zuerst von Hammarsten beobachtete Thatsache, dafs der „Käse", d. i. das von Hammarsten so genannte Labkoagulum, bestimmte Mengen Calciumphosphat enthält, dafs andererseits der durch Säurezusatz zur Milch oder durch freiwillige Säuerung letzterer abgeschiedene Käsestoff keine oder nur sehr geringe Mengen des Phosphates enthält, nicht gegen, sondern mufs eher für die Annahme sprechen: dafs Calciumphosphat in der Milch suspendiert sei. Der durch Säurezusatz abgeschiedene Käsestoff kann deshalb keine oder nur eine sehr geringe Menge Kalkphosphat enthalten, weil das suspen-

dierte Calciumphosphat vor der Gerinnung gelöst wird; an und für sich hat das durch Säure gefällte Kaseïn natürlich nicht die Fähigkeit verloren, einen Niederschlag einzuschliefsen, was daraus zu entnehmen ist, dafs das Fett der ganzen Menge nach, auch von durch Säure gefälltem Kaseïn eingeschlossen wird.

Wenn das unfiltrierbare Calciumphosphat als suspendierter Körper in der Milch vorhanden ist, so mufs derselbe durch Kohlensäure zu lösen sein, ohne dafs durch diesen denkbar mildesten Eingriff eine die sonstigen Verhältnisse der Milch tangierende Wirkung ausgeübt würde. Ein solcher die Lösung der suspendierten Phosphate beabsichtigender Versuch wurde in folgender Weise ausgeführt.

Da die Filtration einer Milch, in welche vor und während der Operation Kohlensäure eingeleitet wurde, ein von Calciumkarbonat getrübtes Serum lieferte, welches sich aus dem Bikarbonat in der Luftleere der Thonzelle gebildet hatte, so wurde hier die Methode der Aufsaugung des Milchserums durch Thonplatten in einem Kohlensäurestrom vorgezogen. Zu diesem Behufe wurde in frisch gemolkene, abgekühlte Milch Kohlensäure geleitet; 100 ccm so mit Kohlensäure behandelter Milch wurden auf eine der erwähnten Thonplatten gebracht, diese auf einen Luftpumpenteller gestellt, mit einer Glasglocke überdeckt und durch letztere ein kontinuierlicher Strom gewaschener Kohlensäure geleitet. Das Gaszuführungsrohr mündete am Boden des Luftpumpentellers, das passend gebogene Ableitungsrohr an der höchsten Spitze der Glasglocke. Im übrigen wurde wie früher verfahren und gerechnet (auf gleichen Chlorgehalt bezogen u. s. w.).

1 l Milch enthielt an unfiltrierbarer Phosphorsäure und an unfiltrierbarem Calciumoxyd:

(Siehe Tabelle auf S. 382.)

Der beschriebene Versuch zeigt, dafs durch Einleiten von Kohlensäure in frische Milch 44—72 pCt. der unfiltrierbaren Phosphorsäure und 21—67 pCt. des unfiltrierbaren, nicht an Kaseïn gebundenen Calciumoxyds der Milch in die filtrierbare Form übergeführt werden, oder dafs die entsprechenden Mengen unlöslichen Calciumphosphates durch die Kohlensäure gelöst werden.

Ebenso wie die Kohlensäure wirkt selbstredend auch eine andere Säure, welche Calciumphosphat zu lösen vermag, z. B. Essig-

Nr.	Kaseïn	Ohne Kohlensäure-Behandlung: Phosphorsäure: Im ganzen in der Asche	Ohne Kohlensäure-Behandlung: Phosphorsäure: Nach Abzug der aus dem Phosphor des Kaseïns entstandenen Menge	Ohne Kohlensäure-Behandlung: Calciumoxyd: Im ganzen in der Asche	Ohne Kohlensäure-Behandlung: Calciumoxyd: Nach Abzug der am Kaseïn gebundenen Menge	Mit Kohlensäure-Behandlung: Phosphorsäure: In der Asche	Mit Kohlensäure-Behandlung: Phosphorsäure: Nach Abzug der aus dem Phosphor des Kaseïns entstandenen Menge	Mit Kohlensäure-Behandlung: Phosphorsäure: Durch Kohlensäure gelöst: g	Mit Kohlensäure-Behandlung: Phosphorsäure: Durch Kohlensäure gelöst: in Prozent der in der Milch enthaltenen „präformierten" Phosphorsäure	Mit Kohlensäure-Behandlung: Calciumoxyd: In der Asche	Mit Kohlensäure-Behandlung: Calciumoxyd: Nach Abzug der am Kaseïn gebundenen Menge	Mit Kohlensäure-Behandlung: Calciumoxyd: Durch Kohlensäure gelöst: g	Mit Kohlensäure-Behandlung: Calciumoxyd: Durch Kohlensäure gelöst: in Prozent der in der Milch nicht an Kaseïn gebundenen Menge
a	b	c	d	e	f	g	h	i	k	l	m	n	o
6	26,0	1,20	0,697	0,94	0,550	0,71	0,209	0,488	70,0	0,68	0,277	0,273	47,2
7	25,1	1,23	0,730	0,96	0,626	0,91	0,424	0,320	43,8	0,83	0,496	0,130	20,7
10	26,1	1,21	0,704	1,14	0,736	0,70	0,194	0,510	72,0	0,65	0,246	0,490	66,5

säure, wie der folgende Versuch zeigt, der gleichzeitig angiebt, dafs die Menge der gelösten Kalkphosphate von der Menge der zugesetzten Säure abhängt; die zur Milch hinzugesetzten Essigsäuremengen sind nicht so grofs, dafs durch dieselben etwa Kaseïn gefällt wird. 100 ccm Milch brauchen zur Gerinnung in der Kälte 30—34 ccm $^1/_4$ Normal-Essigsäure. Die angewandten Mengen Essigsäure genügen aber, um die Milch beim Kochen zur Gerinnung zu bringen.

	Im Plattenrückstande		Gelöst durch Essigsäure	
	CaO	P_2O_5	CaO	P_2O_5
100 ccm Milch + 15 ccm Wasser . . .	0,139	0,137	—	—
100 „ „ + 10 „ $^1/_4$ Norm.-Essigs.	0,097	0,101	0,042	0,037
100 „ „ + 15 „ „	0,065	0,069	0,074	0,068

Es ist gar kein Grund vorhanden, die Thatsache,

dafs etwa die Hälfte der in der Milch enthaltenen Phosphorsäure und des Calciumoxyds nicht im Serum gelöst resp. nicht durch eine poröse Thonwand zu filtrieren sind;

dafs die unfiltrierbaren Phosphorsäure- und Kalkmengen in der Milch sich in dem Verhältnisse finden, wie in einem unlöslichen Calciumphosphat (Dicalciumphosphat resp. ein Gemenge von Di- und Tricalciumphosphat);

dafs durch Einleiten von Kohlensäure in frische Milch, resp. Versetzen derselben mit einer zur Fällung des Kaseïns weit unzureichender Menge Essigsäure, ein grofser Teil unfiltrierbarer Phosphorsäure und unfiltrierbaren Kalkes in filtrierbaren Zustand übergehen und nun im Serum gelöst auftreten;

dafs durch Einleiten von Kohlensäure in frische Milch annähernd prozentisch gleiche Mengen von Phosphorsäure und Calciumoxyd filtrierbar gemacht werden,

anders zu deuten, als

dafs die im Serum nicht gelöste Phosphorsäure und der nicht gelöste Kalk in der Milch in Form unlöslicher Kalkphosphate — der Hauptmenge nach als Dicalciumphosphat, zum Teil auch als Tricalciumphosphat — suspendiert sind.

Diese Anschauung, welche in der ungezwungensten und befriedigendsten Weise eine Reihe von Erscheinungen erklärt, würde, wie schon bemerkt wurde, kaum auf Widerspruch stofsen, wenn

nicht, zuerst von Hammarsten, dem phosphorsauren Kalk der Milch besondere Beziehungen zum Käsestoff und zu den Gerinnungserscheinungen der Milch zugeschrieben worden wäre, und wenn die Anschauungen Hammarstens nicht seitens anderer durch mehr oder minder unzutreffende Angaben eine Stütze erhalten hätten.

Ich lasse hier kurz im Auszuge einige von Hammarsten veröffentlichte Sätze folgen, aus welchen die Stellung des Genannten zu der in Rede stehenden Frage zu entnehmen sein wird.

1. Unter „Kaseïn" versteht Hammarsten[1]) nur das gewöhnliche Kaseïn der Autoren, während er mit „Käse" nur das mit Lab niedergeschlagene Kaseïn bezeichnet. (S. 138.)

2. Der „Käse" aus frischer Milch enthält als hauptsächlichsten Mineralbestandteil eine ziemlich konstante Menge Calciumphosphat; in 100 Teilen fettfreien trockenen Käses 4,25—4,74 pCt. CaO und 3,46—4,00 pCt. P_2O_5. Der aus einer künstlichen Kaseïnlösung durch Aussalzen des Kaseïns abgeschiedene Käse geht in der Übereinstimmung mit dem Käse frischer Milch, sogar soweit, dafs er die gleiche Menge Kalkphosphat wie dieser enthält. (S. 139.)

3. Für das Zustandekommen der Gerinnung mit Lab sind die löslichen Kalksalze der Milch notwendig. (S. 143.)

4. Verschiedene aus künstlichen Kaseïnlösungen mittelst Lab gefällte Käse verhielten sich etwas verschieden. Die Verschiedenheiten beruhten in der verschiedenen Menge und Beschaffenheit der Mineralbestandteile. Vor allem zeigte sich, dafs die *Menge der vorhandenen Phosphorsäure von der gröfsten Bedeutung ist,* und man kann also den Satz aussprechen, *dafs ohne die Anwesenheit einer genügenden Menge von Kalk und Phosphorsäure keine normale* (d. i. mit dem aus der Milch dargestellten ganz identischer) Käse erhalten werden kann. (S. 145.)

5. Nachdem die Bedeutung des Calciumphosphates für die Käsebildung gefunden worden war . . . (S. 145.)

6. Wird durch Säuren wiederholt gefälltes Kaseïn in Kalkwasser gelöst, die Lösung mit Phosphorsäure neutralisiert, so erhält man eine milchigweifse Flüssigkeit, die sich ganz wie Milch verhält, beim Kochen nicht, aber leicht durch Lab gerinnt. Der durch

---

1) Jahresber. f. Tierchem. 1874. Referat des Verfassers selbst über die im Schwedischen erschienene Originalarbeit.

Lab aus dieser Lösung abgeschiedene „Käse“ enthielt in einem Falle ebensoviel Phosphorsäure und Kalk, wie aus frischer Milch abgeschiedener Käse, in den meisten Fällen ist er jedoch ärmer an Calciumphosphat. In der milchigweifsen Flüssigkeit ist das Calciumphosphat durch das Kaseïn in Lösung gehalten. (S. 146.)

7. Die chemische Einwirkung des Labs auf das Kaseïn macht sich auch geltend, selbst in dem Falle, dafs bei Abwesenheit der *nötigen Calciumphosphatmenge* die Gerinnung ausbleibt. (S. 147.)

8. Das Kaseïn selbst ist die Calciumphosphat lösende Substanz der Milch; ob dies von einer chemischen Verbindung zwischen Kaseïn und Calciumphosphat herrühre, konnte nicht ermittelt werden. Der Umstand, dafs durch Dialyse oder Aussalzen nie ein kalkfreies Kaseïn erhalten werden konnte, könnte für eine solche Verbindung sprechen, aber andererseits spricht der nicht konstante Kalkgehalt des durch Dialyse gereinigten Kaseïns, sowie der Umstand, dafs immer eine Menge von Kalk in das Diffusat übertritt, für ein einfaches *Gelöstsein des Calciumphosphates durch das Kaseïn.* (S. 149.)

9. Die Lösungen von *Kaseïncalciumphosphat* [1]) gerinnen nicht beim Sieden, bilden eine Haut und gerinnen noch rascher, als die Milch. (S. 11.)

10. Der Ausdruck „Kaseïncalciumphosphat“ wird (wie Hammarsten in der Anmerkung angiebt) nur der Kürze halber gebraucht, ohne dafs damit über die Art, in welcher das Kaseïn und das Calciumphosphat einander lösen, etwas gesagt werden soll. (S. 11.)

11. Wie das gewöhnliche, hat auch das ganz säurefreie Kaseïn die Fähigkeit, reichliche Mengen von Calciumphosphat zu lösen. (S. 35.)

12. Für die Gerinnung einer Kaseïnlösung mit Lab ist — abgesehen von dem Fermente, dem Kaseïn und dem Lösungsmittel für das letztere — die Anwesenheit einer genügenden Menge von *Calciumphosphat* oder einem *anderen Kalksalze* notwendig. (S. 45.)

13. Durch Dialyse wird Milch Lab gegenüber *gerinnungsunfähig* gemacht; Auflösung von Kalk in der dialysierten Milch

---

1) Festschrift, Upsala.

und Neutralisation mit Phosphorsäure, ruft wieder Gerinnungsfähigkeit hervor. (S. 49).

14. Die Gerinnung vermittelnde Wirkung der Kalksalze betrachtet Hammarsten als festgestellte Thatsache. Der Grund, warum Alex. Schmidt nicht die Kalksalze *(Erdphosphate)* als die gerinnungsvermittelnden Stoffe betrachten konnte, war die Beobachtung... (S. 52.)

15. Wenn man Kaseïn in Kalkwasser löst und mit sehr verdünnter Phosphorsäure neutralisiert, wird man nämlich sogleich finden, dafs nicht nur die Anwesenheit von *Erdphosphaten* überhaupt, sondern vielmehr die Anwesenheit von einer nicht zu kleinen Menge dieser Salze, ein für die Gerinnung *notwendiges Bedingnis* ist. (S. 57.)

16. Für die Gerinnung des Kaseïns mit Lab ist also, abgesehen von dem Kaseïn und dem Ferment, die Anwesenheit von einer genügenden Menge *Calciumphosphat* ein *notwendiges* Bedingnis, wobei doch nicht zu übersehen ist, dafs die Phosphorsäure durch *andere* Säuren, wie *Schwefelsäure*, Kohlensäure und der Kalk durch *andere alkalische Erden*, wie *Baryt*, *Strontian* und *Magnesia* ersetzt werden kann. (S. 60.)

17. Man kann nämlich zeigen einerseits, dafs die durch Lab vermittelte chemische Umsetzung des Kaseïns auch bei vollständiger Abwesenheit von Kalksalzen und ohne sichtbare Veränderung der Flüssigkeit von statten gehen kann, und andererseits, dafs die Ausscheidung des fermentativen Umwandlungsproduktes, also die Gerinnung der Flüssigkeit durch die Unfähigkeit des Käses, das *Calciumphosphat* zu lösen resp. von dem letzteren in *Lösung gehalten* zu werden, bedingt ist. (S. 61.)

18. Eine Lösung von Kaseïn in Natriumphosphat mit Lab in der Wärme digeriert, zeigt keine Veränderung; es hat aber doch eine fermentative Umänderung stattgefunden; die Gerinnung erfolgt, wenn Chlorcalcium zugesetzt wird; das Auftreten dieser Gerinnung rührt daher, dafs das in Natriumphosphat lösliche, in *Calciumphosphat* dagegen unlösliche oder wenigstens schwer lösliche Produkt der fermentativen Umwandlung des Kaseïns (der Käse) durch Zusatz von Chlorcalcium seines Lösungsmittels beraubt wurde. Die Rolle der *Erdphosphate* ist also hauptsächlich die, das Auftreten eines Gerinnsels zu ermöglichen. (S. 62.)

19. Der Käse unterscheidet sich von dem Kaseïn nicht nur durch die Unfähigkeit, gröfsere Mengen von Calciumphosphat in Lösung zu halten, resp. von denselben gelöst zu werden, sondern auch durch eine im allgemeinen geringere Löslichkeit. (S. 62.)

Wie aus diesen zum Teil wortgetreu mitgeteilten Citaten ersichtlich, ist es kaum möglich zu ermitteln, welche Anschauungen Hammarsten eigentlich über das Verhältnis des Kalkphosphates zum Kaseïn und den Prozefs der Gerinnung des Kaseïns durch Lab hat. Man vergleiche hier insbesondere die Citate: 3, 4, 7, 8, 12, 15, 16, 17, 18.

Der gröfste Widerspruch findet sich im Citat 16, in welchem Hammarsten im ersten Absatz die Anwesenheit der Erdphosphate als notwendiges Bedingnis für die Gerinnung des Kaseïns durch Lab hinstellt, während er im zweiten angiebt, dafs Schwefelsäure und Kohlensäure die Phosphorsäure — und Baryt, Strontian und Magnesia den Kalk vertreten könne. Im Citat 17 und 18 beruht aber wieder das Zustandekommen der Gerinnung des Kaseïns durch Lab darauf, dafs das durch den Fermentationsprozefs veränderte Kaseïn der Käse sich deshalb als unlöslicher Körper ausscheidet, weil derselben nicht mehr die Fähigkeit des unveränderten Kaseïns besitzt, Calciumphosphat zu lösen, resp. von letzterem nicht mehr gelöst sein kann. Tritt, wie Citat 16 sagt, die Labgerinnung auch ein, wenn die Phosphorsäure durch Schwefelsäure und der Kalk durch Magnesia ersetzt ist, so pafst die für die Mitwirkung des phosphorsauren Kalkes gegebene Erklärung doch absolut nicht auf die in Wasser lösliche schwefelsaure Magnesia.

Hammarstens Vorstellung von dem Gelöstwerden eines in Wasser an und für sich unlöslichen Calciumphosphates durch Kaseïn gründet sich auf folgendes: Löst [1]) man durch Säuren wiederholt nach Hammarstens Methode gereinigtes Kaseïn in wenig Kalkwasser, so läfst sich die alkalisch reagierende Kalk-Kaseïnlösung durch sehr verdünnte Phosphorsäure neutralisieren, ohne dafs ein bleibender Niederschlag entsteht. Nach beendeter Neutralisation erhält man eine milchigweifse Flüssigkeit, welche in Körperwärme ganz das Aussehen der abgerahmten Milch annimmt. Diese Kaseïnlösung verhält sich ganz wie Milch; sie gerinnt nicht beim Kochen,

1) Jahresber. f. Thierchem. 1874, S. 146.

aber mit Lab. Bei richtig ausgeführter Neutralisation geht die Lösung durch ein einfaches Filter ebenso leicht wie die Milch; widrigenfalls, wenn ein feiner selbst schwer sichtbarer Niederschlag darin suspendiert ist, wird das Filter bald verstopft, das Filtrat wird immer ärmer an Kaseïn und Calciumphosphat, und wegen der Verdünnung gerinnt es zuletzt nicht mehr durch Lab. Der aus solcher künstlichen Milch abgeschiedene Käse enthielt in einem Falle ebensoviel Phosphorsäure und Kalk, als ein aus Milch hergestellter Käse, meist jedoch weniger. (S. 146.) Wie aus dieser Darstellungsmethode ersichtlich ist, hat also das Kaseïn die Eigenschaft das Calciumphosphat in Lösung zu halten. (S. 147.) Dem ist folgendes entgegen zu setzen: Benutzt man unter sonst gleichen Verhältnissen zur Neutralisation oben erwähnter Kalkkaseïnlösungen anstatt Phosphorsäure Salzsäure, so erhält man ebenso eine milchigweifse Flüssigkeit, wie die erwähnte mit Phosphorsäure neutralisierte Lösung. Das milchigweifse Aussehen einer mit Phosphorsäure neutralisierten Kaseïnkalklösung, kann also nicht, wie Hammarsten meint, von dem in irgend einer Weise gelösten Calciumphosphat herrühren. Eine mit Salzsäure neutralisierte milchige Kaseïnkalklösung geht ebenso unverändert durch ein einfaches Filter, wie eine mit Phosphorsäure neutralisierte Lösung oder wie Magermilch. Milchige Trübung der mit Phosphorsäure neutralisierten Kaseïnkalklösung und Unverändertbleiben derselben nach dem Filtrieren steht also in keinem Zusammenhange mit einem allenfallsigen Gehalt der Flüssigkeit an phosphorsaurem Kalk resp. mit der Lösung des letzteren durch das Kaseïn. Dafs eine geringe Menge eines in einer schleimigen Flüssigkeit erzeugten gelatinösen Niederschlags von phosphorsaurem Kalk durch ein Papierfilter geht, beweist andererseits nichts gegen sein Ungelöstsein. An ähnlichen Vorkommnissen, dafs in schleimigen Flüssigkeiten suspendierte Stoffe hartnäckig der Filtration widerstehen, besteht kein Mangel. Man erhält erst dann solche Flüssigkeiten klar, wenn sich das Filter „verstopft" hat und die Filtration nunmehr sehr langsam erfolgt. Eine Verstopfung tritt aber nur dann ein, wenn eine genügende Menge suspendierter Körper in der Flüssigkeit vorhanden ist; bei einem geringen Gehalt der Flüssigkeit indessen oder bei besonderer Kleinheit der suspendierten Partikel tritt die Filterverstopfung nicht ein, und die Flüssigkeit filtriert dauernd trüb. In solchem Falle hilft man sich bekanntlich häufig

durch Suspension von Stoffen, welche die Filterporen leicht verstopfen (Thonerdehydrat, flockige Niederschläge u. s. w.).

Dafs aus mit Phosphorsäure neutralisierter Kaseïnkalklösung mittelst Lab abgeschiedener Käse Calciumphosphat enthält, spricht eher für, als gegen das Ungelöstsein des letzteren in der neutralisierten Kaseïnkalklösung; diese Thatsache steht in keinem Zusammenhang mit dem Gelöststein des Kaseïns vor der Fällung und in keinem anderen Zusammenhang mit dem Unlöslichwerden des durch den fermentativen Prozefs veränderten Kaseïns nach dem Laben, als jenem, welcher zwischen Gerinnung durch Lab in Anwesenheit von Kalksalzen überhaupt besteht, da ja das lösliche Chlorcalcium bei diesem Prozefs dieselbe Rolle, wie das unlösliche Calciumphosphat, spielt. Das Kaseïn ist allerdings auch ein wirkliches Lösungsmittel für unlösliches Calciumphosphat, aber nur insoweit, als dasselbe mit den Eigenschaften einer Säure auftritt. Ebenso wie dasselbe mit freien Basen neutrale Verbindungen eingeht, Kohlensäure aus Karbonaten austreibt, löst es auch Di- und Tricalciumphosphat, wie jede andere Säure; es wird hierbei in der Hauptsache eine lösliche Kaseïnkalkverbindung und Monocalciumphosphat gebildet; letzteres geht aus der sauren Reaktion der nun Calciumphosphat gelöst enthaltenden Flüssigkeit hervor. Würde das Kaseïn ein von der Säurewirkung unabhängiges spezifisches Lösungsvermögen für Calciumphosphat besitzen, so müfste dies auch zur Geltung kommen und nachzuweisen sein, wenn das Kaseïn als neutrale Verbindung auf gefällten phosphorsauren Kalk zur Einwirkung gelangt. 3 g reines Kaseïn wurden mit verdünnter Natronlauge zu einer gegen Lackmus möglichst vollkommen neutralen Flüssigkeit gelöst und mit dieser Lösung ein 1 g Trockensubstanz enthaltendes Gemenge feuchten gallertartigen Di- und Tricalciumphosphates in einer Reibschale verrieben und nach etwa $^1/_2$ stündigem Stehen das Gemisch filtriert. Im Filtrat waren enthalten 2,2 pCt. Kaseïn und in der Asche nur unwägbare Spuren von Kalk. Eine mit Natronlauge neutralisierte Kaseïnlösung — welche also eine Säurewirkung nicht mehr ausüben, aber doch noch freie Basen unter Bildung einer basischen Verbindung aufnehmen konnte — hatte also absolut kein Lösungsvermögen für unlösliches gallertartiges, in der Kälte gefälltes Calciumphosphat.

Bei dem Mangel eines sonstigen Beweises wird die Angabe Hammarstens über das Lösungsvermögen des Kaseïns für Calciumphosphat den hier gemachten Versuchen und Ausführungen gegenüber wohl nicht länger ausreichend sein, die Anschauung aufrecht zu erhalten, dafs das in der Milch enthaltene durch poröse Thonwände nicht filtrierbare Calciumphosphat in irgend einer eigentümlichen Weise gelöst sei. Die Vorstellung, dafs Calciumphosphat in der Milch suspendiert sei, erklärt auch in viel ungezwungener Weise den Gehalt des durch Lab ausgeschiedenen Käses (Hammarsten), das durch Kochsalz oder Alkohol gefällten Kaseïns (Eugling) an unlöslichem Calciumphosphat, als bisher geschehen. Diese Vorstellung weist auch dem in der Milch enthaltenen Calciumphosphat eine minder ausgesprochene Beziehung zu dem Gerinnungsprozefs des Kaseïns durch Lab zu, als jene, welche demselben wenig berechtigterweise bisher zugeschrieben wurde.

In letzterer Beziehung hat namentlich Eugling [1]), wie schon erwähnt, sich sehr bestimmt ausgesprochen; er betrachtet es als völlig feststehend, dafs der Käsestoff der Milch „Kaseïntricalciumphosphat" sei.

Die bemerkenswertesten Sätze aus der Publikation Euglings führe ich hier gekürzt oder wortgetreu in den folgenden Citaten an:

1. Bei diesen Untersuchungen stiefs mir ein *neuer Gesichtspunkt* auf, welcher die Richtung zu nachstehenden Arbeiten gab. Versetzt man frisch gemolkene Milch mit Ammoniumoxalat, so tritt in derselben keine Umsetzung der Calciumsalze zu Calciumoxalat ein; weder mikroskopisch noch chemisch ist der Vollzug der Kalkreaktion nachweisbar. 100 *ccm* Milch mit Ammoniumoxalat versetzt, liefern durch doppeltes Filter filtriert nur wenige Milligramm Calciumoxalat, während etwa das Hundertfache durchschnittlich 0,3 *g* aus der Milch fällbar gewesen sein sollten. (S. 392.)

2. Sind Spuren von Säuren in der Milch gebildet oder derselben zugesetzt, so entstehen gegen Ammoniumoxalat reaktive Calciumverbindungen. (S. 393.)

---

1) Eugling (Landw. Vers.-Stat. XXXI, S. 391 — 405) fafst die Anschauungen Hammarstens in dem Satz zusammen (S. 397): „dafs der Käsestoff eine Verbindung mit Calciumphosphat ist, erkannte Hammarsten . . . ." Es dürfte schwer fallen, diesen in so bestimmter Weise formulierten Satz in den Schriften Hammarstens zu finden.

3. Frische normale Kuhmilch enthält demnach das Calcium in einer festen organischen Verbindung, welche erst zerstört werden mufs, um es in derselben mit oxalsaurem Ammoniak nachzuweisen. (S. 393.)

4. Bei der Mischung von gleichen Volumen Milch und Alkohol bleiben im Mittel nur 11 pCt. der Gesamtkalksalze im Serum, und diese sind in organischer Verbindung, welche nicht gegen Ammoniumoxalat reagiert. (S. 394.)

5. Die Calciumverbindungen der Milch, welche entschieden Albuminatverbindungen sind, zerfallen schon mit schwachen Säuren, Essig-, Milch-, Weinsäure, aber nicht mit Salicyl-, Benzoe- und Bernsteinsäure. Auf Zusatz ersterer Säuren tritt im mikroskopischen Präparat die Calciumoxalatbildung sofort ein, auch wenn die Quantität der Säure den Käsestoff noch nicht koaguliert hat. (S. 395.)

6. Das Kaseïntricalciumphosphat besitzt die Eigenschaft nicht, gegen Ammoniumoxalat zu reagieren, es ist aber leicht zerfällbar. Schon beim Kochen im eigenen Serum wirkt das Milchserum und führt teilweise Umsetzungen herbei. Es wandert nämlich beim Kochen der Milch ein Teil der Phosphorsäure der gelösten Alkaliphosphate aus dem Serum an die Basis der Käsestoffverbindung, und notgedrungen mufs sich jetzt eine Quantität Alkalialbuminat aus dem Käsestoff bilden. Gekochte Milch reagiert demnach nicht mehr amphoter, sondern schwach alkalisch. (S. 399.)

7. Der Käsestoff findet sich bereits in der Milch in Verbindung mit Triphosphat und diese Verbindung vollzieht sich nicht erst unter dem Einflufs des Labfermentes. (S. 399.)

8. Während weder Kochsalzserum noch Alkoholserum Kalk enthalten, der mit Ammoniumoxalat nachweisbar ist, tritt auf Zusatz dieser Reagens sofort Ausscheidung von oxalsaurem Kalk im Labserum ein, ein Beweis, dafs die Labwirkung die bestandene organische Kalkverbindung zerlegte und eine gelöste entstanden ist, welche sich mit dem Reagens umsetzt. (S. 400.)

9. Durch Labfermentwirkung wird die in der Milch enthaltene Kaseïnverbindung zerlegt, es wird eine lösliche gegen Ammoniumoxalat reaktive Calciumphosphatverbindung, welche im Serum verbleibt, gebildet und eine unlösliche mit dem Namen Käse belegte ausgeschieden. — —

Eine Wiederholung der von Eugling ausgeführten Versuche, welche sich jedoch nicht nur auf qualitative Reaktion beschränkte, führte zu Resultaten, die zumeist das Gegenteil von dem ergaben, was Eugling gefunden hatte.

200 ccm frische Milch von der Acidität 3,5 wurden mit 40 ccm einer kalt gesättigten Lösung von oxalsaurem Ammoniak — enthaltend 4 g in 100 ccm — versetzt. Dieses Quantum oxalsaures Ammon (1,6 g) würde genügen, um 0,7 g Calciumoxyd in oxalsauren Kalk zu verwandeln, während in den 200 ccm angewandeter Milch 0,294 g Calciumoxyd enthalten waren. Es wurde also mehr, als die doppelte Menge der theoretisch erforderlichen, angewendet. Ich führe die Menge des angewendeten Oxalats speziell an, um anderen die Kontrolle meiner Versuche zu ermöglichen, und um daran zu erinnern, dafs die Lösung von oxalsaurem Ammon relativ arm an Substanz ist; die Anwendung des angegebenen mäfsigen Überschusses des Fällungsmittels wird wohl als eine berechtigte Mafsregel zu betrachten sein. Die Flüssigkeit wurde nach etwa $^1/_2$stündigem Stehen auf mehrere kleinere doppelte Filter verteilt und in 100 ccm des oxalisierenden Filtrates, welches nach etwa 2 Stunden gewonnen war, nach der Veraschung der Kalkgehalt bestimmt. Von 0,147 g Kalk in 100 ccm Milch fanden sich im entsprechenden Volum des Filtrats (120 ccm) 0,022 g Calciumoxyd. Von 0,212 g Phosphorsäure der Milchasche von 100 ccm Milch fanden sich im Filtrat 0,194 g. Während also von der Phosphorsäure der Milch (inkl. der aus dem Phosphor des Kaseins entstandenen) fast die ganze Menge im Filtrat sich fand, erschienen nur ca. 15 pCt. des Gesamtkalkes im Filtrat. 85 pCt. des Kalkes müssen also als oxalsaurer Kalk gefällt worden sein. Da in der Milch nur 28—47 pCt. (Tabelle S. 76) vom Gesamtkalk im Serum gelöst sind, 53—72 pCt. teils an Kaseïn gebunden, teils als Kalkphosphat in der Milch suspendiert sind, so mufs nicht nur der im Serum gelöst enthaltene, sondern auch der an Kaseïn gebundene und als Phosphat suspendierte Kalk der Hauptmenge nach in oxalsauren Kalk umgewandelt worden sein. Die im Filtrate auftretenden ca. 90 pCt. der (Asche-) Phosphorsäure sind ein weiterer Beweis für das Stattfinden des letztgenannten Vorgangs. Die auf Zusatz des Ammoniumoxalates in der Milch erfolgende, auffallende Veränderung in der Farbe und Durchsichtigkeit zeigt sofort, dafs

die eingetretenen Umsetzungen sich auch auf das Kaseïn erstreckten. Es hat sich unzweifelhaft aus der Kaseïnkalkverbindung die entsprechende Kaseïnammoniumverbindung gebildet. Dafs nicht aller Kalk aus dem Filtrat verschwunden war, beweist nicht, dafs nicht aller Kalk in Oxalat übergeführt wurde, denn es ist bekannt, dafs in der Kälte gefällter oxalsaurer Kalk, zumal nach kurzem Stehen, durch Filtrieren nur aufserordentlich schwer von der Flüssigkeit zu trennen ist.

Die folgenden Versuche bieten den Schlüssel zu den auffälligen Versuchsergebnissen, welche Eugling erhalten hat:

I. 100 ccm Thonzellenfiltrat verascht ergaben 0,055 g CaO. 100 ccm Thonzellenfiltrat direkt ohne Ansäuren mittelst Ammoniumoxalat gefällt:

in der Kälte gefällt: 0,0540 g CaO
kochend heifs „ : 0,0563 „ „

II. 100 ccm Thonzellenfiltrat verascht: 0,092 g CaO, 100 ccm Thonzellenfiltrat mit oxalsaurem Ammon direkt ohne Ansäuern heifs gefällt: 0,098 g CaO; gewogenen Tiegelinhalt in Salzsäure gelöst, schwach essigsauer gemacht und nochmals heifs mit oxalsaurem Ammon gefällt: 0,090 g CaO.

200 ccm Thonzellenfiltrat, enthaltend in der Asche 0,080 g Calciumoxyd in 100 ccm, wurden mit 200 ccm 95 pCt. Alkohol gemischt; es entstand sofort ein Niederschlag, welcher abfiltriert wurde. Der Niederschlag enthielt 0,050 g CaO und 0,042 g P_2O_5, er bestand also aus Tricalciumphosphat; von dem im Thonzellenfiltrate enthaltenen Calciumoxyd wurden sonach 31 pCt. durch Mischen derselben mit 1 Volum 95 pCt. Alkohol ausgefällt. Das gleiche wird der Fall sein, wenn man Milch mit 1 Volum 95 pCt. vermischt; es wird ebenfalls annähernd $^1/_3$ der im Milchserum befindlichen Kalksalze gefällt, was nichts Auffälliges an sich hat.

200 ccm vom ausgeschiedenen Kalk und der Phosphorsäure befreiten Serums wurden mit 5 ccm oxalsaurer Ammonlösung versetzt; es trat starke Opalescenz auf *ohne sichtbaren* Niederschlag. Nach 1stündigem Stehen wurde die Flüssigkeit, die sich mittlerweile in ihrem Aussehen nicht verändert hatte, filtriert, das Filtrat wurde so lange wieder aufs Filter gebracht, bis dasselbe ziemlich klar vom Filter ablief. Der Filterrückstand ergab nach dem

Veraschen	CaO	0.025
durch Alkohol früher ausgefällt . .	„	0,050
	CaO	0,075

In der entsprechenden Menge — 100 ccm — Thonzellenfiltrat waren vorhanden 0,080 g.

Eine Probe des filtrierten alkoholischen Thonzellenfiltrates mit einer entsprechenden Menge oxalsauren Ammons versetzt, welche noch nach 2stündigem Stehen keine wesentliche Änderung in der Opalescenz gezeigt hatte, schied über Nacht einen sehr voluminösen Niederschlag von oxalsaurem Kalk aus, welcher unter dem Mikroskop betrachtet sich als völlig amorph erwies. Zur weiteren Feststellung der Wirkung des Alkohols bei der Kalkoxalatfällung wurden 100 ccm einer wässerigen Chlorcalciumlösung, welche 0,043 g CaO enthielt, mit 100 ccm 95 pCt. Alkohol und dann mit 5 ccm der Lösung von oxalsaurem Ammon versetzt. Es trat wie bei dem Milchserum eine Opalescenz, später Bildung eines flockigen Niederschlags ein, jedoch schneller als bei dem alkoholischen Thonzellenserum. Nach 1stündigem Stehen wurde unter öfterem Zurückgiefsen des Filtrats auf das Filter filtriert. Der Filterrückstand ergab 0,039 g CaO = 90 pCt. der vorhandenen Menge. Der in einer Probe der gleichen Flüssigkeit ausgeschiedene oxalsaure Kalk, unter dem Mikroskop betrachtet, zeigte eine durchaus amorphe Beschaffenheit.

Aus diesen mit Thonzellenfiltraten und reinen Chlorcalciumlösungen ausgeführten Versuchen ergiebt sich:

1. dafs aus dem Thonzellenfiltrat, das ist dem Serum der Milch, sich aller Kalk durch oxalsaures Ammon gerade so wie aus einer wässerigen Lösung eines Kalksalzes quantitativ ausfällen läfst, ohne dafs irgend eine ungewöhnliche Erscheinung bei der Bildung des Niederschlags auftritt;

2. dafs ein Volum 95 pCt. Alkohols zu Milch hinzugesetzt einen Teil des im Milchserum gelösten Kalkes als unlösliches Calciumphosphat ausfällt;

3. dafs ein Alkoholgehalt des Thonzellenfiltrats von etwa 45 pCt. oder einer Lösung von Chlorcalcium von gleichem Kalkgehalt, die Bildung des normalen Calciumoxalats verhindert, insofern als nach Hinzufügung des Ammoniumoxalats nur eine Opalescenz der Flüssigkeit auftritt, welcher erst die Bildung eines Nieder-

schlags nach mehr oder weniger langer Zeit folgt. Der sichtbare Niederschlag ist nicht, wie der in wässerigen Lösungen eines Kalksalzes entstandene, krystallinisch, sondern völlig amorph. Der durchscheinende und in den einzelnen Partikelchen sich nicht abgrenzende Niederschlag, welcher die Opalescenz in der alkoholischen Lösung bedingt, läfst sich, trotzdem derselbe als Niederschlag nicht zu erkennen ist, durch wiederholtes Filtrieren durch ein dichtes Papierfilter von der Flüssigkeit trennen.

Selbstversändlich werden die bei Thonzellenfiltrat und wässerigen Kalksalzlösungen beobachteten Wirkungen eines Alkoholzusatzes sich auch bei der Milch geltend machen, wenn diese mit Alkohol in dem angegebenen Verhältnis gemischt wird. Es wird ein Teil des in dem Milchserum vorhandenen Kalkes als unlösliches Phosphat ausgefällt, in dem alkoholischen Filtrat wird sich auf Zusatz von oxalsaurem Ammon kein sichtbarer Niederschlag bilden, — der in Wirklichkeit aber doch als ein durchscheinender amorpher Körper vorhanden ist und sich zum gröfsten Teil abfiltrieren läfst. Die geringe Menge des im Alkoholserum der Milch vorhandenen Kalkes läfst jedoch das Resultat quantitativer Versuche weniger augenfällig erscheinen.

300 ccm Milch wurden mit 300 ccm 95 pCt. Alkohol versetzt; 100 ccm Filtrat, mit 2,5 ccm oxalsaurem Ammon versetzt, ergaben eine opalisierende Flüssigkeit, welche nach 6stündigem Stehen keinen sichtbaren Niederschlag erkennen liefs. 200 ccm des mit 5 ccm oxalsauren Ammons versetzten Filtrates nach 1stündigem Stehen abfiltriert ergaben: nur 0,010 g CaO. 200 ccm des alkoholischen Filtrats wurden in der Luftleere über Schwefelsäure bei Zimmertemperatur von Alkohol befreit, die Flüssigkeit mit Wasser auf das ursprüngliche Volum gebracht und mit 5 ccm oxalsaurer Ammonlösung versetzt; es entstand sofort eine starke Trübung; nach 1stündigem Stehen hatte sich am Boden des Becherglases ein sichtbarer Absatz gebildet; nach dem Abfiltrieren der Flüssigkeit fanden sich als Filterrückstand 0,020 g Ca ausgeschieden.

Die Resultate dieser Versuche dürften zur Genüge darthun, dafs die Angabe Euglings, es sei der Kalk der Milch in dieser als organische Verbindung vorhanden, welche gegen Ammoniumoxalat nicht „reaktiv“ ist, durchaus unrichtig ist. Eugling gelangt zu dieser Vorstellung auf Grund unrichtiger Versuchsanordnung,

indem er seine Beobachtungen meistens auf das Eintreten oder Nichteintreten sichtbarer qualitativer Reaktionen beschränkte und indem er die eigentümliche Wirkung des Alkohols bei der Bildung von Calciumoxalat unberücksichtigt läfst. Da, wie Eugling sagt, seine über die Nichtfällbarkeit des Calciumoxyds der Milch durch oxalsaures Ammon gemachten Beobachtungen „der neue Gesichtspunkt war, welcher die Richtung zu seiner Arbeit gab", so ist mit dem Nachweis, dafs die Ergebnisse seiner Beobachtungen den thatsächlichen Verhältnissen nicht entsprechen, auch der Nachweis geführt, dafs auch die Folgerungen Euglings, die derselbe an seine Untersuchungsergebnisse knüpft, und welche die Natur des Kaseïns, und dessen Beziehungen zum Calciumphosphat der Milch betreffen, unrichtig sind. Insbesondere mufs die in Citat 7, 8 und 9 von Eugling ausgesprochene Ansicht als durchaus jeder Begründung entbehrend bezeichnet werden, welche Ansicht dahin geht, dafs der Käsestoff in der Milch mit Tricalciumphosphat in chemischer Verbindung sei, und dafs durch die Labwirkung diese Verbindung des Käsestoffs zerlegt werde, da sowohl Alkohol- als Kochsalzserum keinen durch oxalsaures Ammon nachweisbaren Kalk enthalten, während im Labserum sofort auf Zusatz des genannten Reagens Ausscheidung von oxalsaurem Kalk eintrete, was als Beweis dafür diene, dafs die Labwirkung die bestandene organische Kalkverbindung (Kaseïntricalciumphosphat) zerlegte.

Sowohl Kochsalz — als Alkoholserum (letzteres nach Verjagung des Alkohols) enthalten sämtlichen Kalk gerade so in durch oxalsauren Ammon ausfällbarer Form und geben ihrem Kalkgehalt entsprechend ebenso die Kalkreaktion mit oxalsaurem Ammon, wie das Labserum. Wenn Eugling im Labserum die qualitative Kalkreaktion sofort und deutlich erhielt, im Alkoholserum aber nicht, so hat dieses eben daran gelegen, dafs der Genannte die störende Wirkung des Alkohols bei der Bildung des Calciumoxalates übersehen hatte, die selbstredend im alkoholfreien Labserum nicht eintreten konnte. Dafür, dafs Eugling auch im Kochsalzserum keinen durch oxalsaures Ammon fällbaren Kalk fand, kann ich keine Erklärung abgeben. Die Behauptung aber, dafs die leicht kontrollierbare Thatsache:

Kochsalzserum der Milch giebt mit oxalsaurem Ammon eine dem Kalkgehalte entsprechende Kalkreaktion, und der Kalk des

Kochsalzserums läfst sich durch genanntes Reagens quantitativ ausfällen,

zur Wirklichkeit besteht, mufs ich jedoch aufrecht erhalten.

Ebenso unrichtig ist demgemäfs, und auch von anderer Seite aus betrachtet, die in Citat 6 von Eugling ausgesprochene Ansicht, nach welcher beim Kochen der Milch sich das Kaseïntricalciumphosphat zersetze, indem Phosphorsäure aus dem Alkaliphosphate des Serums an die Basis der Käsestoffverbindung gehe, wobei sich notgedrungen Alkalialbuminate[1]) bilden, weshalb gekochte Milch nicht mehr amphoter, sondern schwach alkalisch reagiere.

Erstens ist es nicht zu verstehen, wie durch einen einfachen Basen- und Säureaustausch, um welchen es sich doch nur handeln könnte, die amphotere oder die bei der amphoteren Reaktion zu beobachtende saure Reaktion in die alkalische umschlagen kann, und zweitens widerspricht die Angabe Euglings, dafs gekochte Milch nicht mehr amphoter, sondern schwach alkalisch reagiere, durchaus der Wirklichkeit; auch sie beruht wieder auf einer unrichtigen Beobachtung.

Schon Soxhlet[2]) stellt folgendes fest: „Die alkalische Reaktion der Milch ist in bei weitem stärkerer Intensität zu beobachten, wenn man die Milch erhitzt und sie bei dieser Temperatur mit rotem Lackmuspapier prüft. Eine bei gewöhnlicher Temperatur das rote Papier nur hellviolett färbende Milch färbt in der Hitze geprüft dasselbe dunkelviolett. Läfst man dieselbe Milch wieder erkalten, so zeigt sie ihre alkalische Reaktion in unveränderter Intensität, wie vor dem Erhitzen. Es ist dies eine Erscheinung, welche nichts Charakteristisches für die Milch bietet, sondern allen schwach alkalischen Flüssigkeiten zukommt. Höchst verdünnte Lösung von phosphorsaurem oder kaustischem Natron zeigt ganz dasselbe Verhalten: beim Prüfen in der Hitze eine auffallend stärker alkalische Reaktion. Auch violette Lackmuslösung erscheint in der Hitze (80—90°) merklich mehr blau, als eine mit ihr in gleich dicker Flüssigkeitsschicht verglichene kalte Portion dieser Lösung. Dafs diese Thatsache nur eine Wärmewirkung, nicht etwa

1) Alkalialbuminate reagieren aber gar nicht alkalisch; confr. die citierte Arbeit Soxhlets S. 4.

2) Journ. f. prakt. Chem. N. F. 6, S. 22—23.

Folge einer Konzentrationsveränderung durch Verdampfen sei, geht daraus hervor, dafs die wieder abgekühlte, alkalische Lösung dieselbe Intensität der Alkalescenz wahrnehmen läfst, die sie vor dem Erhitzen zeigte. Ebenso läfst sich die Zunahme der alkalischen Reaktion in der Hitze den amphoter reagierenden Lösungsmengen von neutralem und saurem Alkaliphosphat, oder an einer Lösung von Magnesiaphosphat, welche so viel saures Salz enthält, dafs beim Kochen keine Trübung entsteht, beobachten; die saure Reaktion dieser Lösungen dagegen zeigt in der Wärme keine merkliche Veränderung."

Dafs gekochte und wieder erkaltete Milch keine merkliche Änderung der Acidität erlitten hat, davon kann man sich auch direkt durch quantitative Aciditätsbestimmungen mittelst der Soxhlet-Henkelschen Titriermethode überzeugen. Eine grofse Anzahl von mir untersuchter Milchproben, welche bei Anwendung der vorgeschriebenen 2 ccm 2 pCt. Phenolphtaleïnlösung pro 50 ccm durchschnittlich 3,5 ccm $^1/_4$ Normal-Natronlauge verbrauchten, ergaben, nachdem sie gekocht und wieder abgekühlt waren, gegenüber der gleichen ungekochten Milch keine gröfseren Unterschiede in der Acidität, als einem Mehr- oder Minderverbrauch von 0,1 ccm $^1/_4$ Normal-Natronlauge entsprach, d. h. die Differenzen bewegten sich innerhalb der normalen Beobachtungsfehler nach unten und nach oben.

Bei dieser Gelegenheit mufs ich auch der Angabe Schaffers[1]) widersprechen, dafs bei der Gerinnung durch Lab eine Aciditätsveränderung eintritt. Schaffer glaubt, durch von ihm mit gelabter und ungelabter Milch ausgeführte Aciditätsbestimmungen nach der Soxhlet-Henkelschen Methode — auf welche Versuche ich noch zurückkomme — die Anschauung Euglings über die Natur des Kaseïns stützen zu können, „welcher auf Grund des Verhaltens der in der Milch vorhandenen Kalksalze gegen oxalsaures Ammoniak zu dem Schlusse gelangt, dafs der Käsestoff als eine Tricalciumphosphatverbindung zu betrachten sei."

Insbesondere spricht Schaffer die Behauptung aus, dafs „der Prozefs des Dickens der Milch mit Lab auf einer Umwandlung des Kaseïntricalciumphosphats in eine Verbindung des Kaseïns mit

1) Landw. Jahrb. d. Schweiz 1887.

sauren Calciumphosphaten beruhe", wodurch auch die konstatierte Verminderung des Säuregrades der Milch infolge der Labfermentwirkung erklärt werden kann, weil der Phosphorsäuregehalt der in der Lösung bleibenden Salze dabei vermindert wird.

Ich citiere hier kurz jene Sätze aus der Schafferschen Arbeit, welche sich auf die Änderung der Acidität der Milch, nachdem sie durch Lab zur Gerinnung gebracht wurde, beziehen.

„Von besonderem Werte zur allgemeinen Beleuchtung des Prozesses der Labwirkung erschien mir die Bestimmung des Säuregrades der Milch vor und nach dem Gerinnen derselben durch Labferment. Die Bestimmung des Säuregrades geschah nach Soxhlet und Henkel in der Weise, dafs 50 ccm Milch mit 20 ccm Phenolphtaleïnlösung versetzt und mit $^1/_4$ Normal-Natronlauge titriert wurden. In der durch Lab geronnenen Milch mufste durch starkes Umrühren oder durch Zerreiben des geronnenen Kaseïns *in ziemlich viel Wasser* ein mechanisches Einschliefsen des sauer wirkenden Serums vermieden werden, wovon man sich übrigens leicht durch Kontrollversuche überzeugen konnte. Auf diese Weise wurde in mehr als 200 Fällen in der Milch eine regelmäfsige, schwache Verminderung des Säuregrades durch die Labfermentwirkung konstatiert. Die Differenz betrug zwar meist nur 0,2 bis 0,3 ccm $^1/_4$ Normal-Natronlauge, wie aus der Tabelle ersichtlich ist etc."

In der erwähnten Tabelle sind 45 vergleichende Bestimmungen aufgeführt, bei welchen viermal zwischen gedickter und ungedickter Milch keine Differenz, in den übrigen Fällen Differenzen von 0,1 bis 1,3 ccm im Verbrauch von $^1/_4$ Normal-Natronlauge pro 50 ccm Milch gefunden wurden.

Schaffer hat bei der Ausführung zwei Fehler begangen, bei deren Vermeidung er gefunden hätte, dafs die Acidität der Milch durch Einwirkung des Labs absolut keine Änderung erfährt. Zur Vermeidung des ersten Fehlers mufs man für die feine Verteilung des sich ausscheidenden Kaseïns schon während der Labeinwirkung Sorge tragen, d. h. man mufs die Milch während der Labeinwirkung kontinuierlich schütteln (man kann ja den Gerinnungsprozefs in 2 bis 3 Minuten durch Anwendung entsprechender Labmengen sich vollziehen lassen); in diesem Falle erhält man eine feinflockige Ausscheidung und dieselben Werte für gelabte, geronnene Milch,

wie für ungelabte. Da, wie früher gezeigt wurde, das Kaseïn der Milch noch Basen aufnimmt, bevor die Milch gegen Phenolphtaleïn alkalisch reagiert — das Thonzellenfiltrat hat etwa nur die halbe Acidität, wie die Milch — das Kaseïn sich also dem Phenolphtaleïn gegenüber wie die sauren Phosphate der Milch verhält, so mufs durch feine Verteilung des gefällten Käsestoffes gesorgt werden, dafs die Acidität desselben auch zur Wirkung gelange.

Der zweite und gröfsere Fehler, den Schaffer begangen, besteht darin, dafs er in manchen Fällen die Verteilung des in der Ruhe ausgeschiedenen Kaseïns durch starkes Umrühren, in anderen Fällen („oder!“) „durch Zerreiben des geronnenen Kaseïns *in ziemlich viel Wasser*“ bewirkte. Ein Wasserzusatz zur Milch modifiziert aber die Resultate der nur für vergleichende Versuche bestimmten empirischen Titriermethode von Soxhlet und Henkel in sehr bedeutender Weise, wie folgende Versuche zeigen. Bei einem Zusatze von 4 ccm einer 2prozentigen Phenolphtaleïnlösung zu 100 ccm Milch wurde verbraucht:

100 ccm	Milch					6,0	ccm	$^1/_4$ Normal-Natronlauge
„	„	„	+	100	ccm Wasser	5,0	„	
„	„	„	+	200	„ „	4,4	„	
„	„	„	+	500	„ „	3,7	„	
„	„	„	+	1000	„ „	3,5	„	

Hiermit dürfte festgestellt worden sein, dafs eine schwache Abnahme der Acidität, welche „meist nur 0,2—0,3 ccm betrug“, gegen obige Differenzen nichts bedeutet und nur das Resultat einer unrichtigen Versuchsanordnung ist.

Von dem bemerkenswerten Einflufs des Wassers auf das Resultat der Aciditätsbestimmung kann man sich übrigens auch durch den folgenden sehr augenfällig wirkenden Versuch überzeugen. Hat man einen Titrierungsversuch beendet, wobei die Milch eine eben bemerkbare Fleischfarbe angenommen hat, und vermischt man nun dieselbe mit einer gröfseren Menge Wasser — selbstverständlich ausgekochtes destilliertes Wasser, welches sich gegen Phenolphtaleïn indifferent verhält — so wird die Flüssigkeit sofort intensiv rot gefärbt: sie zeigt also nun gegen Phenolphtaleïn stark alkalische Eigenschaften, resp. sie verhält sich wie eine stark übertitrierte Milch.

Dieses eigentümliche Verhalten der Milch steht mit den ursprünglichen oder den bei Zusatz der Natronlauge sich bildenden unlöslichen Calciumphosphaten der Milch in Zusammenhang, wie folgender Versuch beweist.

Versetzt man Kalkwasser unter Zusatz von Phenolphtaleïn mit so viel sehr verdünnter Phosphorsäure, dafs die rote Farbe der Lösung eben völlig verschwindet, und verdünnt man nun mit viel Wasser, so tritt sofort wieder intensive Rotfärbung der Flüssigkeit ein. Filtriert man hingegen nach beendeter Neutralisierung von dem gebildeten Calciumphosphat ab, so verändert das Filtrat bei Wasserzusatz seine Farbe nicht, wohl aber färbt der Filtrierrückstand Wasser, das etwas Phenolphtaleïn enthält, wieder intensiv rot. Die Erscheinung kann nur in der Weise erklärt werden, dafs eine Lösung des in Wasser schwer löslichen Calciumphosphats gegen Phenolphtaleïn alkalisch reagiert; d. h. es bildet sich durch Verdünnung der eben neutralisierten Lösung durch Wasserzusatz neuerdings eine alkalisch reagierende Lösung von Calciumphosphat. Bei Ausführung dieser Versuche ist es gleichgültig, ob man zu dem Kalkwasser die Phosphorsäure zufügt, oder zu letzterer das Kalkwasser, d. h. ob der gebildete Niederschlag von Calciumphosphat der Hauptmenge nach als Di- oder als Tricalciumphosphat besteht. Bei Verdünnung der Lösungen, welche bei Neutralisation von Natronlauge mit Phosphorsäure, oder von Kalkwasser mit Salzsäure unter Zusatz von Phenolphtaleïn erhalten werden, tritt die beschriebene Rotfärbung nicht auf.

Vermeidet man, wie hier dargelegt, die von Schaffer begangenen Fehler bei Ausführung der Titrierversuche, d. h. erzielt man die unerläfsliche feine Verteilung des bei der Labfällung sich abscheidenden Kaseïns durch kontinuierliches Schütteln der Milch, und unterläfst man jede Verdünnung der geronnenen Milch, so findet man, dafs die Acidität der Milch durch die Behandlung mit Lab keine Veränderung erfährt, wie folgende von mir erhaltene Versuchszahlen beweisen.

Es verbrauchten 100 ccm Milch bevor und nachdem sie durch Lab innerhalb 2—3 Minuten zur Gerinnung gebracht wurde:

Vor der Gerinnung 6,0 ccm $^1/_4$ Normal-Natronlauge
Nach der „ 6,0 „ „

Vor der Gerinnung	6,2 ccm	$^1/_4$ Norm. Natronlauge
Nach „	6,1	„
Vor „	8,1 ccm	„
Nach „	8,1	„
Vor „	7,8 „	„
Nach „	7,8 „	„

Was die weiteren Beweise betrifft, welche Schaffer für die Hypothese beibringt, dafs der Käsestoff Kaseïntricalciumphosphat sei, welche Beweise, wie er sagt, die Angaben Euglings direkt bestätigen, so bestehen dieselben in folgendem:

1. Der nach Schaffers Untersuchungen mit Lab aus frischer Milch gefällte Käsestoff enthält 5—8 pCt. Asche, welche fast ausschliefslich aus Calciumphosphat besteht.

2. Durch Auswaschen des gefällten Käsestoffes wird dessen Aschengehalt nicht beeinflufst.

3. Der aus Milch mit höherer Acidität gefällte Käsestoff ist aschenärmer, als der aus Milch mit geringerer Acidität abgeschiedene.

Beweis 1 ist nichts anderes, als eine Wiederholung der von Hammarsten zuerst gemachten Angabe, nach welcher Käse aus frischer Milch eine ziemlich konstante Menge Calciumphosphat — auf 100 Teile fettfreier Trockensubstanz 4,25—4,75 CaO und 3,46 bis 4,00 P_2O_5 enthält. (Citat 2, S. 139.)

Diese Angabe Hammarstens wird auch von Eugling wiederholt, welcher (S. 402), ohne besondere Versuche oder Einzelzahlen anzuführen, angiebt, dafs ein normaler mit Lab bereiteter Käse in 100 Teilen fettfreiem Käsestoff 8,25—8,75 Teile Calciumverbindungen enthält, welche ziemlich genau einem Gemische von 1 Mol. Tricalciumphosphat und 1 Mol. Monohydrocalciumphosphat entsprechen.

Während man sonst in der Litteratur über Eiweistoffe einen hohen Aschengehalt der letzteren auf eine mangelhafte Reinigung dieser Stoffe zurückführt, wird hier die in grofser Menge vorhandene Asche ohne weiteres als konstituierender Bestandteil einer chemischen Verbindung betrachtet. Hammarsten findet „ziemlich“ konstante Mengen, Schaffer 5—8 pCt. Asche, Eugling, aber ohne Zahlen mitzuteilen, 8,25—8,75 pCt. „Calciumverbindungen“ im Käse. Hieraus soll nun folgen, dafs der Käsestoff eine chemische Verbin-

dung von Kaseïn mit Calciumphosphat sei, während doch von keiner Seite Zahlen vorgebracht werden, dafs im Käsestoff ein ganz bestimmtes Verhältnis von Kaseïn zu Calciumoxyd und Phosphorsäure vorhanden ist, was für die Beurteilung, ob man es mit einem Gemenge oder einer chemischen Verbindung zu thun hat, doch in erster Linie zu wissen notwendig ist. Eine annähernde Konstanz, wie sie sich in den Schafferschen Zahlen von 5 — 8 pCt. Asche für den durch Lab gefällten Käsestoff ausspricht (Differenzen, die sich wie 100 : 160 verhalten), findet man in der Zusammensetzung der Milch überhaupt; so z. B. kommen in der Milch ziemlich konstant auf 100 Teile Kaseïn 100—120 Teile Fett; man wird deshalb auch dieses Verhältnis von Kaseïn zu Fett in dem durch Lab gefällten Käse finden, welcher das suspendierte Fett einschliefst. Dasselbe wird der Fall sein, wenn suspendiertes Calciumphosphat in der Milch vorhanden ist; bei der Konstanz des Aschengehaltes der Milchtrockensubstanz und bei der im wesentlichen wenig verschiedenen Zusammensetzung der Milchasche wird auch der Gehalt an suspendiertem Kalkphosphat seine Konstanz — wenn hier überhaupt von Konstanz gesprochen werden kann — aufweisen, wie sie in dem Aschengehalt des durch Lab gefällten Käse zu finden ist.

Der zweite für die hier kritisierte Hypothese Euglings von Schaffer beigebrachte Beweis besteht in der Vorführung von Versuchen, welche zeigten, dafs eine verschieden weit getriebene Auswaschung den Gehalt des Kaseïns an Asche gar nicht beeinflufst. Von drei verschiedenen Milchsorten wurden je 100 ccm mit Lab zur Gerinnung gebracht und der ausgefällte Käsestoff in einem Falle einen Tag, im zweiten zwei Tage lang ausgewaschen und nun von Schaffer gefunden, dafs der mit Äther entfettete Trockenrückstand enthielt:

	I	II	III	
Nach 1 Tag langem Auswaschen	5,05	5,01	5,70	pCt. Asche
„ 2 „ „ „	5,37	4,90	5,04	„ „

Aus diesen Zahlen ist nichts zu ersehen, weil nicht angegeben wurde, wie viel Asche der unausgewaschene Käse enthalten hat — die ja zwischen 5—8 pCt. nach Schaffers Angaben schwankt — und weil nicht angegeben ist, wieviel Kaseïn in Lösung gegangen war resp. weil die *absoluten* Zahlen für Kaseïn und Asche fehlen.

Ist annähernd ebensoviel Käsestoff in Lösung gegangen als Asche, so wird der Aschengehalt des Rückstandes auch annähernd unverändert bleiben, wie dieses hier der Fall ist. Dafs übrigens zwischen ein und zwei Tage langem Auswaschen doch nicht zu geringe Differenzen erhalten wurden, zeigt Versuch III. Ganz abgesehen davon, dafs es besonders schwierig ist, aus dem derben Kaseïngerinnsel auch eingeschlossene gelöste Stoffe auszuwaschen, ist die beschriebene Versuchsordnung für die Entscheidung der Frage ganz ungeeignet, ob man es in dem durch Lab gefällten Kaseïn mit einer chemischen Verbindung von Kaseïn mit Calciumphosphat oder mit einem Gemenge beider resp. mit Kaseïn zu thun hat, welches das in der Milch suspendiert vorhandene ohnehin schwer lösliche Di- und Tricalciumphosphat mechanisch in derselben Weise einschliefst, wie es das Fett der Milch eingeschlossen hält.

Der dritte Beweis Schaffers für die Existenz des Kaseïntricalciumphosphates besteht wieder in der Wiederholung der schon von Hammarsten gemachten Angabe, deren Inhalt auch Eugling (S. 402) bestätigt, dafs der durch Lab aus schwach saurer Milch gefällte Käse aschenärmer ist, als der Käse frischer Milch.

Es leuchtet ein, dafs bei einer Zunahme der Acidität der Milch die Menge des suspendierten Calciumphosphates in der Milch abnehmen mufs, was nach meinen Versuchen auch schon bei Einleiten von Kohlensäure in die Milch eintritt, und dafs bei einem geringen Gehalt der Milch an suspendiertem Kalkphosphat auch der gefällte Käse ärmer an eingeschlossenem Phosphat resp. Asche sein mufs.

Der Mindergehalt des aus gesäuerter Milch durch Labfällung erhaltenen Käses an Asche ist also weder ein Beweis dafür, dafs in der Milch eine chemische Verbindung von Kaseïn mit Tricalciumphosphat enthalten sei, noch dafür, dafs überhaupt das Kaseïn mit dem Kalciumphosphat der Milch in irgend einer Beziehung stehe.

Weitere Schlufsfolgerungen, welche mit diesem Gegenstande im Zusammenhange stehen, knüpft auch Schaffer an den Phosphorsäuregehalt der Asche des durch Lab aus frischer und aus gestandener Milch von höherer Acidität gefällten Käses. (S. 8 u. 9.) In aus frischer Milch normal ausgefälltem Käse enthielt die Asche

46,3—50,9 pCt. Phosphorsäure; während die Asche des aus gestandener Milch von höherer Acidität durch Lab ausgeschiedenen Käses 53,7—56,56 pCt. Phosphorsäure enthielt. Dem Phosphorsäuregehalt der Asche ersteren Käses entsprechen Zahlen, welche zwischen den für Tri- und Dicalciumphosphat resp. Calciumpyrophosphat berechneten stehen (45,8—55,9); die für den Phosphorsäuregehalt der Asche letzterer Käsestofffällung gefundenen Zahlen stimmen hingegen fast genau mit den sich auf saures resp. pyrophosphorsaures Calcium beziehenden (55,9 pCt. P_2O_5) überein. Hierbei, gleichwie bei allen Fragen, welche den Phosphorsäuregehalt der Milch, des Käses etc. betreffen, übersieht aber Schaffer ebenso, wie Euggling, die von Hammarsten ja schon im Jahre 1882—83 festgestellte Thatsache, dafs das Kaseïn 0,85 pCt. Phosphor enthält, welcher bei der Verbrennung 1,94 pCt. Phosphorsäure giebt. Bei der Veraschung von Käse aus frischer Milch sind soviel Basen (CaO) vorhanden, dafs alle Phosphorsäure, sowohl die aus dem Phosphor des Kaseïns sich bildende, als die schon vorhandene, in der Asche als Ortho- resp. Pyrophosphat sich vorfinden kann. Man findet deshalb in solchem Käse oder in der Milch oder im Plattenrückstand frischer Milch, in deren Asche ja, wie gezeigt wurde, ein bedeutender Basenüberschufs enthalten ist, den gleichen Phosphorsäuregehalt in der Asche, ob man nun den Trockenrückstand ohne Zusatz einer Base verascht — kohlensaures Natron, Baryt etc. — oder mit einem solchen Zusatz, oder ob man den Rückstand in ein Gemisch von schmelzendem Salpeter und Ätzkali einträgt, wie folgende Versuche zeigen.

100 ccm Milch, eingedampft und ohne Zusatz verascht, gaben 0,223 g P_2O_5.

100 ccm derselben Milch mit Baryt eingedampft und verascht gaben 0,224 g P_2O_5.

100 ccm mit Salpetersäure eingedampft und in Kali-Salpeterschmelze verbrannt gaben 0,2242 g P_2O_5.

Thonplattenrückstand, das eine Mal ohne Zusatz verascht, ergab 0,0915 P_2O_5, das andere Mal in Kali-Salpeterschmelze verbrannt, 0,0898 g P_2O_5.

Anders verhält sich die Sache, wenn man der Milch so viel einer Mineralsäure z. B. Schwefelsäure zusetzt, dafs alle Phosphate in saure Salze verwandelt werden, oder dafs sogar freie Phosphor-

säure vorhanden ist, oder wenn man durch einen Zusatz irgend einer Säure zur Milch nicht nur den suspendierten phosphorsauren Kalk löst, sondern auch dem Kaseïn einen Teil der an dasselbe gebundenen Base entzieht und nun das aus solcher Milch dargestellte Lab-Käsekoagulum ohne einen Zusatz verascht. Es wird dann das eintreten, was bei der gewöhnlichen Darstellung des Phosphors eintritt. Ein Teil der Phosphorsäure wird durch die Kohle zu Phosphor reduziert, welcher entweicht und nur so viel der Phosphorsäure bleibt in der Asche, als durch anwesende Basen in der Form von Di- oder Triphosphaten gebunden werden kann. Das nach Hammarsten rein dargestellte Kaseïn enthält 0,85 pCt. Phosphor, welche 1,94 pCt. Phosphorsäure geben; soll der ganze Phosphor des Kaseïns als Pyrophosphat in der Asche erscheinen, so müssen 100 Teile Kaseïn 3,46 Teile Calciumpyrophosphat geben resp. es müfsten auf 100 Teile reines Kaseïn 1,52 Teile Calciumoxyd während der Veraschung vorhanden sein. Die neutrale Kalkkaseïnverbindung enthält nur in der That auf 100 Teile Kaseïn 1,55 Teile Calciumoxyd, also gerade genug, um allen Phosphor des Kaseïns als Phosphorsäure in der Asche erscheinen zu lassen und 100 Teile neutraler Kaseïnkalk müssen demnach mindestens 3,34 pCt. Asche (als Pyrophosphat) liefern. In den von Schaffer mitgeteilten 4 Analysen von durch Lab aus gesäuerter Milch abgeschiedenem Käsestoff enthielt der Käse einmal 2,74 pCt. und ein andermal 0,52 pCt. Es war also in beiden Fällen durch die Säurewirkung nicht nur aller suspendierter phosphorsaurer Kalk der Milch in Lösung gegangen, sondern auch der in der Milch enthaltenen Kaseïnkalkverbindung Kalk entzogen, deshalb bei der Veraschung ein Teil des Kaseïn-Phosphors verflüchtigt und nur jener Teil der Phosphorsäure, die sich aus dem Phosphor des Kaseïns bildete, konnte in der Asche erscheinen, welche mit dem vorhandenen Calcium Pyrophosphat bilden konnte. Dafs in der Asche des seines Kalkgehaltes mehr oder minder beraubten Kaseïns sich regelmäfsig der gleiche Phosphorsäuregehalt wie im Calciumpyrophosphat einstellt, diese Thatsache steht also durchaus in keinem Zusammenhang mit der „Umwandlung der Tricalciumphosphatverbindung in die Verbindung des Eiweifsstoffes mit saurem Calciumphosphat“, wie Schaffer annimmt, sondern entspricht vielmehr einer bei der Aschenanalyse längst bekannten Erscheinung, die zu

der bekannten Vorsichtsmafsregel geführt hat, Phosphorsäure enthaltende organische Substanzen, deren Phosphorsäure bestimmt werden soll, unter Zusatz von kohlensaurem Natron, Baryt etc. zu veraschen. Ein durch Lab gefällter Käse, der nicht mehr als 3,34 pCt. Calciumpyrophosphat bei der Veraschung liefert, enthält überhaupt weder präformierte Phosphorsäure, also auch nicht irgend ein Calciumphosphat, noch ist er als eine chemische Verbindung von einem Eiweifskörper mit Calciumphosphat aufzufassen; derselbe stellt vielmehr eine Verbindung von Kaseïn mit Calciumoxyd dar, welch letzteres mit der aus dem Phosphor des Kaseïns bei der Veraschung entstehenden Phosphorsäure unlösliches Calciumphosphat bildet.

Wie schon erwähnt, giebt die neutrale Kaseïnkalkverbindung, bei welcher sich die aus dem Phosphor entstandene Phosphorsäure und der Kalk ziemlich genau in dem Verhältnis wie im Dicalciumphosphat finden, in der Asche ein dem Calciumpyrophosphat entsprechendes Verhältnis von Phosphorsäure zu Calciumoxyd; wird dem Kaseïn durch Säurewirkung Kalk entzogen, so stellt sich aus den vorgeführten Gründen von selbst wieder das Verhältnis des Pyrophosphates in der Asche her. Das gleiche Verhältnis von Phosphorsäure zu Kalk in der Asche wird sich bei Käse finden, wenn derselbe in der Milch suspendiert enthaltenes Dicalciumphosphat einschliefst; ist aber neben Dicalciumphosphat auch Tricalciumphosphat suspendiert, so wird das in Rede stehende Verhältnis sich dem einem Gemenge von Pyrophosphat und Tricalciumphosphat entsprechenden um so mehr nähern, zu je gröfserem Teile das in der Milch suspendierte Calciumphosphat aus Tricalciumphosphat besteht. Da wie früher angegeben das Verhältnis von Phosphorsäure zu Kalk in dem in der Milch enthaltenen suspendierten Calciumphosphat sich einmal mehr dem Verhältnisse des Dicalciumphosphates, das andere Mal mehr dem Verhältnisse des Tricalciumphosphates zuneigt, so hat es nichts Befremdliches, wenn nach Schaffer in dem aus frischer Milch abgeschiedenen Käse der Phosphorsäuregehalt der Asche zwischen 46,3 und 51,3 pCt. schwankt und Gemengen von Di- und Tricalciumphosphat entspricht.

Hätte Schaffer die Ausführung einer bekanntermafsen notwendigen Mafsregel bei der Veraschung nicht unterlassen und

letztere z. B. unter Zusatz von kohlensaurem Natron ausgeführt, und hätte in der so erhaltenen Asche das Verhältnis von Phosphorsäure zu Calciumoxyd bestimmt, so wäre er bei der Analyse des Labkäses, in welcher er 0,52 pCt. Asche mit 56,36 pCt. Phosphorsäure fand, zu einem sehr merkwürdigen Resultate gekommen: er hätte dann gefunden, dafs der Käse bei etwa 0,29 pCt. Kalk 1,94 pCt. Phosphorsäure enthält, von welch letzterer 0,74 pCt. als Monocalciumphosphat und 1,2 pCt. als freie Phosphorsäure sich berechnet hätten!

Der Ausgangspunkt der gegenwärtig mehrfach verbreiteten Anschauung, dafs der Käsestoff der Milch als eine Verbindung von Kaseïn mit phosphorsaurem Kalk zu betrachten sei, ist in den Untersuchungen Hammarstens über die Wirkung des Labes zu suchen und zwar in der wichtigen Entdeckung Hammarstens, dafs die Gerinnung der Milch durch das Labferment an die in der Milch enthaltenen Kalksalze geknüpft sei. Die bei der Ausführung dieser Versuche mit reinem Kaseïn gemachten Beobachtungen, welche das Verhalten von Kaseïnlösungen betrafen, die durch Lösen von Kaseïn in Kalkwasser oder in phosphorsaurem Natron hergestellt und mit Phosphorsäure bezw. mit Chlorcalcium versetzt waren, veranlafsten Hammarsten zu den schon citierten Aussprüchen, welche die Beziehungen der Kalkphosphate der Milch zum Käsestoff betreffen. Diese Aussprüche wurden zum Teil schon an früherer Stelle einer Kritik unterzogen; es erübrigt aber noch weiter zu zeigen, dafs die in der Milch enthaltene und als suspendiert anzunehmende Kalkphosphatmenge ebensowenig mit dem Gelöstsein des Käsestoffes und sonstigen Eigenschaften desselben, als mit der Fähigkeit des letzteren zusammenhängt, durch Lab zu gerinnen.

Die von Hammarsten selbst gefundene Thatsache (Citat 16), dafs Kaseïnlösungen, welche an Stelle des Kalkes andere alkalische Erden Ba O . Sr O, Mg O und an Stelle der Phosphorsäure: Schwefelsäure oder Kohlensäure enthalten, gleichfalls durch Lab gerinnen, beweist: dafs für die Gerinnung des Kaseïns durch Lab die Anwesenheit von Kalkphosphat kein notwendiges Bedingnis ist, und dafs andere in der Milch enthaltene Kalk-(resp. Magnesia-)salze, und zwar die im Serum gelösten, die Gerinnung zu stande kommen lassen können.

Lundberg [1]) fand weiter ebenfalls, dafs Kaseïnlösungen durch Lab gerinnen, wenn anstatt Kalk in der Lösung zugegen ist: Baryt, Strontian oder Magnesia und anstatt der Phosphorsäure: Kohlensäure, Schwefelsäure, Salzsäure, Salpetersäure,

„aber sonderbarerweise gelang es Lundberg ebensowenig, wie früher Hammarsten, durch Neutralisation von einer kalkhaltigen Kaseïnlösung mit Oxalsäure eine mit Lab gerinnende Flüssigkeit zu erhalten. Dieses führte Lundberg zu den Versuchen, eine Lösung von Kaseïn in Barythydrat mit Schwefelsäure zu neutralisieren; auch in diesem Fall blieb die Gerinnung mit Lab aus.“ (Hammarsten als Referent im Jahresbericht für Tierchemie.)

Im Hinblick auf die Unlöslichkeit des oxalsauren Kalks und des schwefelsauren Baryts ist der letzte Befund nicht schwer zu deuten: es ist zum Zustandekommen der Labgerinnung nicht die Anwesenheit von Erdalkalisalzen überhaupt, sondern die Gegenwart von *löslichen* Erdalkalisalzen in der Kaseïnlösung notwendig. Hält man diese Anschauung fest, so wird man auch der Gegenwart von unlöslichen suspendiertem Kalkphosphat in der Milch für die Gerinnung derselben durch Lab keine andere Bedeutung beimessen, als dem oxalsauren Kalk und schwefelsauren Baryt in den nicht gerinnenden Kaseïnlösungen Lundbergs und Hammarstens.

Ein wichtiger Versuch Hammarstens bestand darin, dafs er Milch, welche er durch 24 Stunden der Dialyse unterworfen hatte, der Labwirkung aussetzte: Diese von den *löslichen* Kalksalzen befreite Milch gerann *nicht*. Über die Zusammensetzung solcher nicht gerinnender Milch findet sich keine Angabe, aber es sind nur 2 Fälle möglich:

1. Die Milch war nur von den im Serum gelösten Kalksalzen befreit, enthielt aber noch jene Menge Kalkphosphat, welche nicht durch ein Thonzellenfilter passieren; dann war der Mangel an den gelösten Kalksalzen des Serums die Ursache der Nichtgerinnbarkeit und die in der Kaseïnlösung zurückgebliebenen Calciumphosphatmengen — seien dieselben suspendiert oder durch Kaseïn gelöst,

---

1) Jahresber. f. Tierchem. 1876, S. 11 aus „Upsala läkare förenings förhandlingar.

oder mit diesem chemisch verbunden — waren unfähig, die Gerinnung durch Lab zu vermitteln.

2. Die ganze Menge des Calciumphosphats war in das Diffusat übergegangen, und das Kaseïn enthielt nur jene Calciumoxydmengen, die der Kaseïnkalkverbindung zukommt, dann konnte das Nichtgerinnen der dialysierten Milch durch Lab ebenso auf die durch Thonfilter nicht filtrierbare Calciumphosphatmenge zurückgeführt werden, als auf die filtrierbaren löslichen Kalksalze des Serums.

In diesem Falle kann aber a) der Käsestoff keine chemische Verbindung von Kaseïn mit Calciumphosphat sein, da eine chemische Verbindung durch Dialyse allein nicht zerlegt werden kann; b) das Verhältnis, den Vorstellungen Hammarstens entsprechend, nicht bestehen, dafs einerseits das Kaseïn die Calciumphosphat lösende Substanz, und dafs andererseits das Calciumphosphat der kaseïnlösende Körper der Milch ist, denn dann würde durch die einfache Dialyse der Käsestoff dadurch, dafs ihm sein Lösungsmittel: das Calciumphosphat, entzogen würde, zur Gerinnung gebracht werden. Durch Dialyse gerinnt aber die Milch nicht, und sie war auch nicht in Hammarstens Versuche geronnen, sondern hatte nur ihre Gerinnungsfähigkeit durch Lab verloren.

Der besprochene Versuch Hammarstens spricht also ebenso wie die Unfähigkeit des Calciumoxalats und Baryumsulfats, die Labwirkung zu ermöglichen, dafür, dafs es in der Milch die im Serum gelösten Kalksalze sind, an welche die Gerinnungsfähigkeit der Milch gebunden ist.

Es waren hauptsächlich zwei Versuche Hammarstens, welche neben der Thatsache, dafs der aus Milch abgeschiedene Käse unlösliches Kalkphosphat enthält, zu der Vorstellung Anlafs gaben, dafs das Kaseïn der Milch in mehr oder weniger inniger Beziehung zu den Kalkphosphaten der Milch und zu dem Labgerinnungsprozefs steht; in beiden Versuchen handelt es sich um die Herstellung der Gerinnungsfähigkeit von Kaseïnlösungen, dadurch, dafs in denselben eine gewisse Menge Calciumphosphat erzeugt wurde und zwar durch:

1. Versetzen einer Lösung von Kaseïn in Dinatriumphosphat mit Chlorcalcium und

2. durch Neutralisieren einer Kaseïnkalklösung mit Phosphorsäure.

ad 1. Man erhält nach Hammarsten eine mit Lab sehr gut gerinnende Kaseïnlösung, wenn man so viel reines trockenes Kaseïn in einer Lösung von 0,5 pCt. Dinatriumphosphat löst, dafs eine Lösung von 4—6 pCt. Kaseïn resultiert, und diese mit einem gleichen Volum einer Chlorcalciumlösung von 0,44 pCt. $Cal._2$ allmählich versetzt. Diese Lösung wird beim langsamen Erwärmen ganz weifs wie Milch, ohne zu gerinnen, und hat ungefähr denselben Gehalt an Kaseïn und Phosphorsäure, wie die Milch.

Die von Hammarsten angewendeten Mengen phosphorsauren Natrons und Chlorcalciums befinden sich in dem Verhältnis zu einander, dafs auf 1 Molekül Dinatriumphosphat gerade 1 Molekül Chlorcalcium kommt.

Man könnte nun auf den ersten Blick glauben, dafs die genannten Salze sich geradeauf in Chlornatrium und Dicalciumphosphat umsetzen, dafs man es hier mit einer Flüssigkeit zu thun habe, in welcher Dicalciumphosphat durch das Kaseïn gelöst sei, und dafs die Gerinnungsfähigkeit der Lösung durch Lab, durch den Gehalt der Lösung an jenen von dem Kaseïn gelösten Erdphosphaten bedingt sei.

Hiegegen ist folgendes zu bemerken: Wie schon Soxhlet[1]) hervorhob, erhält man beim Vermischen von Chlorcalcium und Dinatriumphosphat stark saure Lösungen, welche neben unlöslichem Calciumphosphat saure Phosphate in Lösung halten.

Ein Gemisch beider Salze in beliebigem Verhältnis enthält immer lösliche Kalksalze, in welchem Verhältnisse man auch immer beide Lösungen mischt.

Hier wurden, wie in dem Versuche Hammarstens, 100 ccm der 0,5 pCt. Natriumphosphatlösung mit 100 ccm 0,44 pCt. Chlorcalciumlösung gemischt und von dem entstandenen Niederschlag abfiltriert. Das Filtrat ergab starke Kalkreaktion, enthielt in 100 ccm 0,040 g CaO = 19 pCt. der angewendeten Menge, und 100 ccm derselben Lösung verbrauchten 4 ccm $^1/_4$ Normal-Natronlauge zur Neutralisation (Phenolphtaleïn).

---

1) Journ. f. pr. Chem. N. F. 6, S. 29.

Löst man in der Lösung des Natriumphosphats vor dem Chlorcalciumzusatz Kaseïn, welches, wie schon ausgeführt, die Eigenschaften einer Säure besitzt, so nimmt die Lösung saure resp. amphotere Reaktion an, und ein dem Basenbindungsvermögen des Kaseïns entsprechender Anteil des Dinatriumphosphats wird in Mononatriumphosphat verwandelt, welches eine äquivalente Menge Chlorcalcium in Lösung läfst; oder verreibt man das Gemisch von Dinatriumphosphat und Chlorcalcium mit Kaseïn, so löst, wie jede andere Säure, letzteres seinem Basenbindungsvermögen entsprechende Mengen unlöslichen Calciumphosphats zu löslichem Monocalciumphosphat: in dem einen wie in dem anderen Fall müssen sich nicht unbeträchtliche Mengen löslicher Calciumsalze in der Kaseïnlösung befinden, und die Lösung mufs enthalten:

a) Eine Kaseïnnatron- oder Kaseïnkalkverbindung, welche nicht mehr der Base gebunden enthalten kann, als der „neutralen" Verbindung entspricht, denn die Lösung reagiert sauer resp. amphoter.

b) Di- und Tricalciumphosphat in suspendiertem Zustande; (für die Annahme, dafs diese in der milchig trüben Flüssigkeit gelöst sind, ist absolut kein Anhaltspunkt gegeben).

c) In Wasser lösliche Kalksalze in Form von Chlorcalcium oder Monocalciumphosphat.

Eine sich gegen Lab etc. gleich verhaltende Kaseïnlösung erhält man nach Hammarsten durch Neutralisieren einer Kaseïnkalklösung mittelst Phosphorsäure; „doch kann es ziemlich schwierig sein, einem teilweise veränderten Kaseïn durch Auflösen in Kalkwasser und Zusatz von Phosphorsäure den zur Gerinnung mit Lab *erforderlichen* Gehalt an *Calciumphosphat* zu geben, ohne dafs dabei das Kaseïn ausgefällt wird." [1])

Da solche mit Phosphorsäure neutralisierte Kaseïnlösungen eine schwach saure Reaktion haben müssen, wenn sie durch Lab gerinnen sollen, so ist von vornherein anzunehmen, dafs dieselben in Wasser lösliches Calciumphosphat enthalten. Der folgende Versuch zeigt, dafs dieses auch thatsächlich der Fall ist.

Reines trockenes Kaseïn wurde in so viel Kalkwasser gelöst, dafs die Lösung auf Phenolphtaleïn eben deutlich alkalisch rea-

1) Zeitschr. f. physiol. Chemie 7, S. 240.

gierte; zu der nun filtrierten Flüssigkeit wurde so viel 0,3 pCt. Phosphorsäure tropfenweise unter Umrühren hinzugesetzt, dafs die Lösung schwach saure Reaktion zeigte; ein geringerer Phosphorsäurezusatz, als angewendet, verleiht der Lösung amphotere Reaktion, und die Lösung gerinnt nicht durch Lab. Die angewandte Phosphorsäuremenge war eben ausreichend, um die Gerinnung durch Lab zu ermöglichen. Die Lösung enthielt in 100 ccm:

Kaseïn = 2,27 pCt.
CaO = 0,072 g
P_2O_5 = 0,083 „ (in der unter Sodazusatz erhaltenen Asche).

P_2O_5 als solches in der Lösung enthalten . . . = 0,040 g
CaO gebunden an Kaseïn als neutrale Verbindung = 0,0351 g
CaO gebunden an P_2O_5 . . . . . = 0,0369 g

Auf 100 P_2O_5 im Kalkphosphat treffen 92 CaO.

Ein Teil der Kaseïnlösung wurde durch eine Thonzelle filtriert. Das Filtrat enthielt in 100 ccm:

Kaseïn = 0,1 pCt.
CaO = 0,0116 g
P_2O_5 = 0,021 „

Verhältnis von P_2O_5 : CaO wie 100 : 55,4.

Verhältnis im Monocalciumphosphat 100 : 39,4.

100 ccm des Thonzellenfiltrates verbrauchten zur Neutralisation (Phenolphtaleïn) 1,2 ccm $^1/_4$ Normal-Natronlösung.

Aus diesem Versuch ergiebt sich:

1. Dafs die Hauptmenge des in der Kaseïnlösung gebildeten Calciumphosphats, als eine in Wasser unlösliche und durch eine poröse Thonwand unfiltrierbare Verbindung in der Flüssigkeit enthalten war und sich wie jenes Calciumphosphat in der Milch verhielt, welches nicht in das Thonzellenfiltrat übergeht, bei der Abscheidung des Käses durch Lab aber sich im Käse vorfindet.

2. Dafs ein Teil des Kalkes und der Phosphorsäure sich in wasserlöslicher Form im Serum der Kaseïnlösung als eine durch eine poröse Thonwand filtrierbare Verbindung befindet. Dem Verhältnis nach, in welchem Phosphorsäure und Kalk zu einander stehen, besteht das gelöste Kalkphosphat zum Teil aus Mono-, zum Teil aus Dicalciumphosphat.

Es befinden sich also in den nach Hammarsten dargestellten, Kaseïnkalk und Calciumphosphat enthaltenden Lösungen neben dem

suspendierten Calciumphosphat, von welchem Hammarsten annimmt, daſs es in irgend einer Form durch das Kaseïn gelöst sei, in Wasser lösliche Kalksalze, und es ist zu untersuchen, ob die ersteren oder die letzteren für die Kaseïngerinnung durch Lab notwendig sind. Zur Entscheidung dieser Frage und zur näheren Präzisierung der Verhältnisse, welche bei der Labwirkung in Betracht kommen, seien die folgenden Versuchsergebnisse angeführt.

1. Eine Kaseïnlösung (2,8 pCt.), welche mit so viel Kalkwasser bereitet wurde, daſs die Lösung schwach sauer (Lackmus) reagierte, also „kaseïnsauer" ist, gerinnt nicht beim Kochen, wird beim Erwärmen auf 40° milchig trübe und gerinnt bei 35° C. *nicht* durch Lab. Die Lösung enthält neben Kaseïnkalk keine Kalksalze.

2. Dieselbe Lösung mit frisch (kalt) gefälltem (Kalkwasser + Phosphorsäure) in Wasser unlöslichem Calciumphosphat in verschiedenen Verhältnissen versetzt, gerinnt *nicht* durch Lab. Die Lösung enthält neben Kaseïnkalk nur unlösliches suspendiertes Kalkphosphat, aber keine in Wasser löslichen Kalksalze.

3. Die unter 1 genannte Lösung wurde mit steigenden Mengen Chlorcalcium versetzt: Die Menge des zugesetzten Chlorcalciums bezieht sich auf 100 ccm der Lösung.

$CaCl_2$ 0,010 = 0,0050 CaO	gerinnt	nicht	beim	Kochen;	nicht	durch Lab.
0,020 = 0,0109 „	„	„	„	„	„	unvollst. Gerinnung.
0,030 = 0,0151 „	„	„	„	„	„	gerinnt vollkommen normal.
0,040 =	„	teilweise	„	„		do.
0,050 =	„		„	„		do.

Aus diesen Versuchen ist mit Sicherheit zu entnehmen, daſs *das in einer Kaseïnlösung suspendierte Calciumphosphat nicht die Fähigkeit hat, die Gerinnung des Kaseïns durch Lab zu bewirken, und daſs zum Zustandekommen letzterer, in Wasser lösliche Kalksalze* in dem *Serum der Kaseïnlösung* enthalten sein *müssen.*

Es ist gleichgültig, ob die löslichen Kalksalze sich als Phosphate oder Chloride etc. in der Lösung befinden, und die Labgerinnung steht mit dem Gehalte der Lösung an Calciumphosphat, welches sich nicht im Serum gelöst befindet resp. nicht durch eine poröse Thonwand filtrierbar ist, in keinem Zusammenhang.

Die Gerinnungsfähigkeit der nach Hammarsten bereiteten Lösung von Kaseïn in Dinatriumphosphat, welche mit einer äquivalenten Menge Chlorcalcium versetzt ist, beruht nicht auf dem Gehalt dieser Lösungen an Calciumphosphat schlechtweg, sie beruht nicht auf dem Gehalt an suspendiertem Calciumphosphat oder auf jener Menge des letzteren, welche sich in dem abgeschiedenen Käse mit eingeschlossen findet, sondern auf dem im Verhältnis zur Gesamtkalkmenge geringen Gehalt der Flüssigkeit an im Serum der Kaseïnlösung gelösten Kalksalzen.

Das Gleiche ist der Fall bei der Hammarstenschen Kaseïnlösung, welche durch Lösen von Kaseïn in Kalkwasser und Neutralisieren mit Phosphorsäure erhalten wird; die für die Gerinnungsfähigkeit unerläfsliche schwachsaure, d. h. eben merklich saure Reaktion der Lösung bringt es mit sich, dafs letztere im Serum gelöste Kalksalze enthält und zwar eine eben genügende Menge um die Labfällung zu ermöglichen. Die von mir untersuchte Lösung enthielt 11,6 mg CaO. Die mit Chlorcalcium versetzte Kaseïnkalklösung mufste zwischen 10,9 und 15,1 mg CaO enthalten, um mit Lab gerinnen zu können.

Die Bedeutungslosigkeit des in der Milch enthaltenen, durch ein poröses Thonfilter nicht filtrierbaren Kalkphosphats der Milch für die Gerinnung der Milch durch Lab und die Notwendigkeit der im Serum gelösten Kalksalze, welche der Hauptmenge nach nur als Chloride und Citrate vorhanden sein können, ergiebt sich überdies, wie schon ausgeführt, aus dem Dialysationsversuche Hammarstens: die dialysierte Milch, die keine anderen Veränderungen erlitten hatte, als dafs ihr die löslichen Salze des Serums entzogen waren, war gerinnungsunfähig.

Durch den hier gelieferten Nachweis:

1. dafs die Anschauungen Euglings und Schaffers, nach welchen der Käsestoff als eine chemische Verbindung von Kaseïn mit Calciumphosphat zu betrachten sei, sich teils auf unrichtige Beobachtungen, teils auf unrichtige Schlufsfolgerungen stützen;

2. dafs dem Kaseïn ein spezifisches Lösungsvermögen für in Wasser unlösliche Phosphate des Kalks nicht zukommt;

3. dafs die in einer künstlichen Kaseïnlösung enthaltenen, in Wasser unlöslichen und im Serum der Kaseïnlösung ungelösten

Calciumphosphate mit der Gerinnung des Kaseïns durch Lab in keinem Zusammenhang stehen,

ist die Behauptung zu rechtfertigen,

dafs das im Serum der Milch nicht enthaltene Calciumphosphat sich einfach suspendiert in der Milch befindet, dafs irgend welche Beziehungen zwischen Kaseïn der Milch und dem in derselben befindlichen unfiltrierbaren Calciumphosphat nicht bestehen; das Kaseïn ist weder die Calciumphosphat lösende Substanz, noch ist es selbst durch Calciumphosphat in Lösung gehalten, noch ist der Käsestoff der Milch eine chemische Verbindung mit Calciumphosphat.

Von den grundlegenden Untersuchungen Hammarstens über die Natur des Kaseïns beweist jene, welche sich auf den Phosphorgehalt [1]) des Kaseïns bezieht, dafs dieser Körper ein besonderer Eiweifskörper ist, welcher mit jenem des Kalialbuminats nicht identisch ist; die in vielfacher Beziehung sich gleich verhaltenden Reaktionen des Käsestoffes und des Kalialbuminats, insbesondere das gleiche Verhalten der beiden zu Säuren, der abändernde Einfluſs der Alkaliphosphate auf die Fällbarkeit der beiden Eiweifskörper durch Säuren machen es aber zur Gewifsheit, dafs *der Käsestoff der Milch als die Verbindung des Eiweifskörpers Kaseïn mit einer Base* zu betrachten ist, in demselben Sinne, wie das Kalialbuminat als die eines Eiweifskörpers mit Kali anzusehen ist. Die salzartige Verbindung des, die Rolle einer Säure spielenden, Kaseïns mit einer Base kann als eine in Wasser lösliche Verbindung betrachtet werden, wenngleich die Unfiltrierbarkeit des in der Milch enthaltenen Kaseïns mehr die schon von verschiedenen Seiten ausgesprochene Deutung gestattet, dafs die scheinbare Lösung des Kaseïns mehr als eine durch Wasseraufnahme verflüssigte, gequollene kolloidale Masse zu betrachten ist. Durch Säurezusatz zu einer solchen Lösung oder durch Hinzufügung einer gewissen Menge saurer Phosphate wird die Base des Käsestoffes abgespalten und das Kaseïn als ein in Wasser unlöslicher resp. nicht quellungsfähiger Körper abgeschieden. Wie die (S. 364) mitgeteilte

1) In Übereinstimmung mit Hammarsten, welcher den Phosphorgehalt des Kaseïns im Mittel zu 0,847 pCt. angiebt, wurde in einem sechsmal gefällten aschefreien Kaseïn durch Verbrennung desselben in einer Kali-, Hydrat- und Salpeterschmelze 0,836 und 0,870 pCt. P. im Mittel 0,853 pCt. gefunden.

Analyse des Thonzellenfiltrates der Milch ergeben hat, findet sich die Gesamtmenge der Alkalien im käsestofffreien Serum der Milch gelöst, während eine bedeutende Menge des Gesamtkalks der Milch im Serum nicht enthalten ist. Der *Käsestoff* der Milch kann also in dieser nur *als eine Verbindung des Kaseïns mit Kalk* enthalten sein und von den zwei Verbindungen des Kaseïns der neutralen mit 1,55 CaO auf 100 Kaseïn und der basischen mit 2,36 CaO auf 100 Kaseïn kann es wieder nur die *neutrale* sein, die in der Milch enthalten ist, wie in dem (S. 369) Mitgeteilten ausführlicher dargelegt wurde.

Eine auffällige Erscheinung bietet das Verhalten der gekochten Milch zu Lab dar. Adolf Mayer [1]) giebt an, dafs durch Erhitzen der Milch auf 75° C. „eine Alteration der Milch eintritt, und dafs Milch noch höher, wie wohl noch lange nicht bis zum Kochpunkt, erhitzt ihre Gerinnungsfähigkeit völlig einbüfst". Eugling [2]) äufsert sich über diesen Gegenstand dahin, „dafs die beim Kochen der Milch gebildeten Verbindungen alkalischer Natur die Labwirkung nicht eintreten lassen", und Schaffer [3]) führt an, „dafs gekochte Milch bekanntlich nicht ausgefällt wird".

Zur Kontrolle dieser Angaben und zur Feststellung der einschlägigen Vorgänge wurden die folgenden Versuche ausgeführt.

Das benutzte Labferment war durch Aussalzen eines Kälbermagenextraktes gewonnen; von dem trockenen Pulver genügte 1 Teil, um 1 Million Teile Milch in 40 Minuten bei 35° C. zur Gerinnung zu bringen.[4]) Das Labpulver wurde in destilliertem Wasser gelöst und die opalisierende Lösung filtriert.

---

1) Milchzeitung, 10. Jahrg., S. 36.

2) a. a. O., S. 399.

3) a. a. O.

4) In seiner Arbeit über „die Darstellung haltbarer Labflüssigkeiten" (Milchzeitung 1877, S. 499) giebt Soxhlet folgendes an: „Ein mit 5 pCt. Kochsalzlösung bereiteter Auszug von getrockneten Kälbermagen kann durch Eintragen von Kochsalz in kleinen Portionen bis auf 10 pCt. Kochsalzgehalt gebracht werden, ohne dafs eine Ausscheidung erfolgt und die Lösung an Wirksamkeit verliert. Ein weiterer Zusatz von Kochsalz ruft gewöhnlich schon sofort eine Trübung in den Auszügen hervor, die sich bei gesteigerter Kalksalzzugabe zu einem sich langsam absetzenden voluminösen Niederschlag gestaltet. Solche Flüssigkeiten zeigen nach der Filtration eine Abnahme der Wirksamkeit von 50 pCt. und darüber." Damit ist gesagt, dafs man durch Eintragen

Bei allen Gerinnungsversuchen mit Lab wurde in der Weise verfahren, dafs 100 ccm auf 35° C. erwärmte Milch in Glasflaschen eingemessen wurden, die in ein Wasserbad mit der konstanten Temperatur 35° C. eingestellt waren. Nachdem konstatiert war, dafs die Milch in den Flaschen die angegebene Temperatur hatte, wurden immer 2 ccm der Fermentlösung der Milch in der Weise zugesetzt, dafs die mit der Fermentlösung gefüllte Pipette in die Milch eingetaucht und dafs der Inhalt der Pipette kräftig in die Milch eingeblasen wurde. Durch den der Entleerung der Pipette folgenden Luftstrom wurde die rasche und innige Mischung der Lablösung mit der Milch erzielt. Nur durch diese Art des Zusatzes der Fermentlösung erhält man, wie die Praxis der Labprüfung im hiesigen Laboratorium seit Jahren gezeigt hat, übereinstimmende Zahlen für die Gerinnungsdauer.

3 l Milch (A) von der Acidität 3,0 wurden über freiem Feuer zum Sieden erhitzt resp. mehr oder länger im schwachen Sieden erhalten. Die der ganzen Menge entnommenen Proben gekochter Milch wurden sofort auf 35° abgekühlt und zu den Gerinnungsversuchen verwendet.

In 100 ccm Milch wurden mit 2 ccm der Fermentlösung enthaltend 2 mg des Labpulvers versetzt.

	Gerinnungszeit
Milch ungekocht	2,5 Minuten
Einmal aufgekocht	10 „
5 Minuten im Kochen erhalten	12 „

---

von Kochsalz das Ferment abscheiden und wenn auch mehr oder weniger verunreinigt als Substanz gewinnen kann.

Von dem auf die angegebene Weise dargestellten graubraunen Pulver genügte 1 Teil, um 1 Million Teile Milch von der Acidität 3,5 in 40 Minuten bei 35° C. zur Gerinnung zu bringen; dasselbe enthielt 64 pCt. Asche (zumeist Kochsalz). Von der organischen Substanz des Labpulvers genügte unter obigen Verhältnissen also 1 Teil für 2,8 Millionen Teile Milch, oder letztere mit einem Kaseïngehalt von 2,8 pCt. berechnet: *1 Teil der organischen Substanz des Labpulvers genügte, um rund 100 Millionen Teile Kaseïn in 40 Minuten bei 35° C. zur Gerinnung zu bringen.* —

Hammarsten giebt an (Festschrift, S. 63), dafs ein von ihm durch Alkohol aus einem Labglycerinauszug gefälltes Ferment 0,42 Millionen Teile Kaseïn koagulierte, dafs dieser Niederschlag entschieden nur zur Hälfte aus Labferment bestand, und dafs das reine Ferment 0,8 Millionen Teile Kaseïn zur Gerinnung brachte; doch sei damit noch nicht die Grenze erreicht.

		Gerinnungszeit
10 Minuten	im Kochen erhalten	16 Minuten
20 „	„ „ „	21 „
30 „	„ „ „	30 „

Als von der 5 Minuten im Sieden erhaltenen Milch 6 Stunden später eine Probe behufs Anstellung eines Kontrollversuchs mit der gleichen Labmenge versetzt wurde, gerann dieselbe nach 3 Stunden nicht; auch eine 2. Probe nicht, die mit der doppelten Labmenge versetzt war. Bei einer gekochten Probe einer anderen Milch war jedoch die Gerinnungsfähigkeit nach 6stündigem Stehen erhalten, resp. die Gerinnungsdauer nur etwas verlängert. Die Acidität der letzteren Milch war nicht bestimmt, da jedoch die Acidität der Milch A eine verhältnismäfsig niedrige war, so konnte möglicherweise das Eintreten der Gerinnungsunfähigkeit nach 6stündigem Stehen auf letzteren Umstand zurückgeführt werden. Zur Aufklärung dieser Erscheinung wurden 3 l Milch B von der relativ niedrigen natürlichen Acidität 2,9 (Soxhlet-Henkel) 5 Minuten im Sieden erhalten, 3 l derselben Milch durch Zusatz von $^1/_4$ Normal-Salzsäure auf die mittlere Acidität der Milch von 3,5 (Milch C) gebracht, eine gleichlange Zeit gekocht und beide Milchproben auf ihr Verhalten in oben genannter Richtung geprüft.

Milch B. Acidität 2,9.

2 ccm Lab = 4 mg;	ungekocht	1,5 Minuten,	
Labpulver;	gekocht, sofort geprüft .	56 „	
	„ 6 Stunden später	gerinnt nicht, auch nicht nach Verdoppelung der Labmenge,	
	„ 24 „ „	gerinnt nicht, auch nicht nach Verdoppelung der Labmenge.	

Milch C. Acidität 3,5.

2 ccm Lab = 4 mg;	ungekocht	0,7 Minuten,
Labpulver;	gekocht, sofort geprüft .	9 „
	„ 6 Stunden später	12 „
	„ 24 „ „	23 „

Die Angabe, dafs gekochte Milch durch Lab nicht gerinnbar sei, kann also im allgemeinen nicht aufrecht erhalten bleiben; bis zu einer halben Stunde im Sieden erhaltene Milch zeigt kurze Zeit nach dem Kochen geprüft nur eine Verringerung des Gerinnungsvermögens; gekochte Milch von geringerer Acidität (bis 3,0) verliert aber das Gerinnungsvermögen nach mehrstündigem Stehen,

während gekochte Milch von mittlerer Acidität auch nach längerem Stehen (24 Stunden) die Gerinnungsfähigkeit nicht einbüfst.

Eugling will aus der Analyse des Alkoholserums gefunden haben, „dafs beim Aufkochen von 1 l Milch 18—20 cg Phosphorsäure aus dem Serum in den aufgequollenen Käsestoff dislociert werden, durch diesen Vorgang habe sich alsdann eine ausreichende Quantität Verbindungen alkalischer Natur gebildet, um die Labwirkung nicht eintreten zu lassen, weil trotz der mitunter neutralen[1]) Reaktion der Milch Verbindungen alkalischer Natur vorhanden sind. Kocht man die Milch auf und setzt zum Liter 20 cg Phosphorsäure oder acidimetrisch gleichwertige Mengen Schwefelsäure, Salzsäure, Essigsäure oder Milchsäure, so tritt die Labwirkung genau in gleicher Stärke wieder ein, als wenn die Milch früher nicht aufgekocht worden wäre, nur ist das ausgeschiedene Koagulum aus gekochter Milch zarter und weniger zusammenhängend, als das aus frischer." (S. 399.)

Wie noch gezeigt werden wird, wird durch das Kochen der Milch aufser Phosphorsäure auch Kalk aus dem Serum abgeschieden, d. h. es scheidet sich einfach beim Kochen der Milch unlösliches Calciumphosphat aus dem Serum ab, und dieses, nicht Phosphorsäure allein, wird „in die aufgequollene Käsestoffverbindung dislociert", oder, richtiger gesagt, wird bei der Fällung des Käsestoffs durch Alkohol von dem Gerinnsel mit eingeschlossen. Mit der aus dem Serum verschwindenden Phosphorsäure verschwinden auch entsprechende Mengen Kalk, damit aber auch die Gelegenheit zur Bildung von „Verbindungen alkalischer Natur". Der Effekt, den ein Phosphorsäurezusatz zu gekochter Milch bezüglich der Gerinnungsfähigkeit durch Lab ausübt, ist also in einer anderen Richtung zu suchen, zumal die von Eugling gemachte und zur Aufstellung seiner Hypothese benutzte Angabe nicht bestätigt werden kann, dafs die Gerinnungsfähigkeit gekochter Milch durch den Zusatz von gerade soviel Phosphorsäure, als durch Kochen aus dem Serum verschwunden, wieder genau auf den ursprünglichen Grad zurück gebracht wird.

---

1) Eine neutrale Reaktion existiert aber bekanntlich bei der immer amphoter reagierenden Kuhmilch nicht, ebensowenig wie eine Aciditätsänderung durch das Kochen der Milch stattfindet, was weiter oben schon dargelegt wurde.

Gekochte Milch von der Acidität 2,9, welche nach 6stündigem Stehen gerinnungsunfähig gemacht war, erhielt nachstehende Phosphorsäurezusätze pro 100 ccm nebst 1 mg Labferment in 2 ccm Wasser.

Ungekockte Milch gerann nach . . .			5,5	Minuten,
Gekochte Milch +	20 mg P_2O_5	nach	26	„
„	30 „		17	„
„	40 „		10	„
„	50 „		8	„
„	60 „		6	„ gerinnt beim Kochen
„	70 „		3	„
„	80 „		3	„

Milch von geringer Acidität, welche durch Kochen und nachfolgendes mehrstündiges Stehen gerinnungsunfähig gemacht wurde, kann durch einen Säurezusatz wieder gerinnungsfähig gemacht werden; doch ist etwa die 3fache jener Phosphorsäuremenge notwendig, die nach Eugling aus dem Serum verschwindet und die derselbe als ausreichend bezeichnet, um das ursprüngliche Gerinnungsvermögen der Milch wieder herzustellen.

Aus diesen Versuchen ergiebt sich:

Milch von mittlerer Acidität (3,5) wird durch 5 Minuten langes Kochen nicht gerinnungsunfähig gemacht; solche gekochte Milch gebraucht gegenüber ungekochter Milch bei gleichen Labmengen aber eine längere Zeit zur Gerinnung, oder sie verbraucht, um in gleicher Zeit wie ungekochte Milch zu gerinnen, mehr Lab; die Gerinnungsfähigkeit solcher (gekochter) Milch nimmt bei längerem Stehen ab, insofern nach 24stündigem Stehen die Gerinnungsdauer bei gleichen Labmengen um das ca. $2^1/_2$fache verlängert wird. Die Gerinnungsdauer der gekochten Milch ist unmittelbar nach dem Kochen etwa 13 mal und nach 24 Stunden etwa 23 mal so lang, als die der ungekochten Milch, und Milch von geringerer Acidität zeigt unmittelbar nach dem Kochen eine stärkere Verringerung der Gerinnungsfähigkeit, als Milch von höherer resp. mittlerer Acidität.

Aufser der Veränderung, welche die Milch durch Kochen in Bezug auf die Gerinnungsfähigkeit überhaupt erleidet, verändert sich dieselbe auch in der Weise, dafs die Art der Gerinnung eine andere, als bei ungekochter Milch, wird; anstatt eines zusammenhangenden Koagulums tritt eine flockige Gerinnung auf; die Bil-

dung eines zusammenhangenden aber lockeren schwammigen Koagulums zeigt sich erst bei längerem Stehen der geronnenen Milch; auch scheidet sich bei gekochter Milch über dem Gerinnsel, an Stelle klarer Molken, eine milchig trübe Flüssigkeit ab.

Auch längeres, halbstündiges Stehen hebt die Gerinnungsfähigkeit der Milch kurz nach dem Kochen nicht auf, auch bei einer Milch nicht, welche durch längeres Stehen nach dem Kochen gerinnungsunfähig wird. Die beobachtete Verzögerung der Gerinnung bei längere Zeit gekochter Milch (Milch B) kann ebenso gut auch auf die Veränderung zurückgeführt werden, welche die Milch nach dem Kochen auch bei gewöhnlicher Temperatur erleidet.

Die durch längeres Stehen gekochter Milch von geringerer Acidität eintretende Veränderung macht sich auch in der Richtung bemerkbar, dafs bei länger gestandener Milch der Säurezusatz einen geringeren Effekt äufsert, als bei Milch, welche kürzere Zeit nach dem Kochen bei gleicher Säuremenge gelabt wird.

	Sofort nach d. Kochen	nach 6 Stund.	nach 24 Stund.
Ohne Zusatz	56 Minuten	— Minuten	— Minuten
(Ungekocht 1,5 Minuten)			
40 mg P_2O_5	4,5 „	6 „	10 „

Versetzt man eine Milch von geringerer Acidität (3,5), welche durch Kochen und darauffolgendes Stehen *nicht* gerinnungsunfähig gemacht werden kann, sondern nur eine Abschwächung des Gerinnungsvermögens erlitten hat, mit einer Säure, so wird deren Gerinnungsfähigkeit gesteigert, d. h. es gerinnt die Milch unter sonst gleichen Umständen in kürzerer Zeit, oder sie verbraucht, um in gleicher Zeit wie ohne den Zusatz zu gerinnen, eine geringere Fermentmenge, wie die mit Milch C angestellten Versuche zeigen.

	Sofort nach d. Kochen	nach 6 Stund.	nach 24 Stund.
Gekocht ohne Zusatz	9 Minuten	12 Minuten	23 Minuten
Mit 40 mg P_2O_5 . .	2,5 „	3,5 „	4 „

In diesem Falle handelt es sich also nicht um die Wiederherstellung des verloren gegangenen Gerinnungsvermögens durch den Säurezusatz, sondern letzterer wirkt hier nur gerinnungsbeschleunigend auf die an und für sich gerinnbare Milch, deren Gerinnungsfähigkeit aber durch Kochen geschwächt worden war. Auf dieses Verhalten gekochter, aber noch an und für sich gerinnbarer Milch, wird später noch zurückgegriffen werden.

Der Befund Euglings, dafs ein Säurezusatz zu gekochter Milch letztere wieder durch Lab gerinnbar mache — (resp., wie hier gezeigt wurde, das geschwächte Gerinnungsvermögen mehr oder weniger wieder herstelle), wurde von Schaffer[1]) auch auf die Kohlensäure ausgedehnt; derselbe fand, dafs stark aufgekochte und wieder abgekühlte Milch unter fortwährendem Einleiten von Kohlensäure dreimal so rasch gerann, als eine Probe der ungekochten Milch. Hieran knüpft Schaffer die Bemerkung, dafs „der Kohlensäure eine sehr wichtige Rolle bei der Labeinwirkung zugeschrieben werden müsse," und dafs „auch die in der frischen Milch natürlich vorhandene Kohlensäure bei der Gerinnung durch Lab entschieden mitwirkt." Selbstverständlich kann eine andere Kohlensäure, als die in der Milch „natürlich vorhandene", überhaupt nicht in Frage kommen, wenn es sich um die Gerinnung der Milch durch Lab handelt. Die entschiedene Mitwirkung der Kohlensäure findet Schaffer speziell in dem folgenden Versuchsergebnis begründet: 100 ccm einer Milch wurden durch Lab in 21 Minuten koaguliert, während eine zweite Probe dieser Milch, „die aber zuvor eine halbe Stunde lang in der Temperatur 35—40° C. zur Befreiung von der Kohlensäure umgerührt worden war," mit der gleichen Labmenge in 26 Minuten zur Gerinnung kam. Die mit Bezug auf diesen Gegenstand von mir ausgeführten Versuche ergaben folgendes:

3 verschiedene Milchproben wurden unmittelbar nach dem Melken, noch warm, unter die Glocke der Luftpumpe gebracht, unter welcher sich eine Schale mit Ätzkali befand. Die Luft wurde bis auf einen Quecksilberdruck von 12 mm ausgepumpt und die Milch $^1/_2$ Stunde in dem luftverdünnten Raum stehen gelassen. Die so entkohlensäuerte Milch wurde in Bezug auf ihre Gerinnungsfähigkeit in schon beschriebener Weise mit der ganz frischen, kohlensäurehaltigen Milch verglichen. Um zu zeigen, dafs die Differenzen nicht etwa auf Beobachtungsfehlern beruhen, wurde jeder Versuch doppelt ausgeführt. 100 ccm Milch mit 0,1 mg Labpulver in 2 ccm Wasser waren geronnen bei 35° C.

	CO_2-haltige	CO_2-freie Milch	
I. a)	54 Min.	56,5 Min.	+ 2,5
b)	54,5 „	57,0 „	+ 2,5

1) a. a. O.

CO_2-haltige	CO_2-freie Milch	
II. a) 33,5 Min.	36,0 Min.	+ 2,5
b) 34,5 „	34,0 „	— 0,5
III. a) 44,0 „	46,0 „	+ 2,0
b) 45,0 „	46,5 „	+ 1,5

Würden die Kontrollversuche nicht beweisen, dafs die Beobachtungsfehler geringer sind, als die Differenzen zwischen der Gerinnungsdauer der kohlensäurehaltigen und kohlensäurefreien Milch, so würde man auf Grund des kaum deutlich zum Ausdruck gelangenden verschiedenen Verhaltens der Vergleichsproben überhaupt eine Verschiedenheit derselben in Abrede zu stellen mit Recht geneigt sein können. Bei bestehender Sachlage mufs aber die Konstanz der Unterschiede in den Gerinnungszeiten zu der Schlufsfolgerung führen, dafs in der That die in der Milch enthaltene Kohlensäure einen Einflufs auf die Gerinnungsfähigkeit ausübt; aber dieser Einflufs ist ein so minimaler, dafs er kaum zu konstatieren ist und weder für das Verständnis des Labprozesses, noch praktisch von irgend einer Bedeutung ist.

Die Wertlosigkeit der in der Milch enthaltenen Kohlensäure für den Gerinnungsprozefs in praktischer Beziehung und das Unzutreffende der Bemerkung Schaffers, dafs der Kohlensäure eine sehr wichtige Rolle bei der Labeinwirkung zugeschrieben werden müsse, mufs deshalb ausdrücklich betont werden, weil Schaffer die Bedeutung derselben im Hinblick auf die Praxis der Käsefabrikation besonders hervorhebt, wie sich aus dem folgenden Citate ergiebt: „Durch vorstehende Arbeit ist zwar bewiesen worden, welch grofse Bedeutung der Mitwirkung der Säure und speziell der Kohlensäure bei der Gerinnung der Milch durch Lab zukommt etc.“ — und — „Wenn eine Milch auch nur infolge eines höchst unvorsichtigen Transports und daher eingetretenen Verlustes der natürlich vorhanden gewesenen Kohlensäure mit Lab schlecht dickt, so kann dieses für die Fabrikation die ganz gleichen Folgen haben, wie wenn die gleiche Milch dieselbe Erscheinung infolge sonstiger anderer Ursache zeigen würde.“ Selbstverständlich steht auch das Gerinnungsunfähigwerden der Milch durch Kochen mit der durch das Erhitzen verbundenen Austreibung der Kohlensäure in keiner Beziehung.

Es wurde an früherer Stelle die Thatsache hervorgehoben,

dafs Milch von mittlerer Acidität, welche durch Kochen auch nach längerem Stehen ihre Gerinnbarkeit durch Lab nicht eingebüfst hat, sondern in ihrem Gerinnungsvermögen nur geschwächt wird, durch einen Säurezusatz eine Steigerung der Gerinnungsfähigkeit erleidet. Diese Thatsache deutet darauf hin, dafs bei der Wiederherstellung des gänzlich verloren gegangenen Gerinnungsvermögens gekochter und längere Zeit gestandener Milch durch einen Säurezusatz dieselben inneren Veränderungen in der gekochten Milch vor sich gehen müssen, wie bei der Steigerung des Gerinnungsvermögens durch einen Säurezusatz zur Milch überhaupt, und dafs das Wesen dieses Vorganges mit den Beziehungen zwischen Acidität und Gerinnungsfähigkeit der Milch an und für sich in direktem Zusammenhang stehen müsse.

Auf die Abhängigkeit der Gerinnungsdauer, unter sonst gleichen Umständen, von der Acidität, oder, wenn man will, Alkalinität der Milch, hat zuerst Soxhlet aufmerksam gemacht, wenn auch von anderen Gesichtspunkten ausgehend, als nach dem gegenwärtigen Stand unserer Kenntnisse über die Labwirkung zulässig sind. Derselbe [1]) zeigte, dafs Zusätze von Milchsäure zur Milch die Gerinnungszeiten verkürzten, Zusätze von kohlensaurem Natron letztere verlängerten; in 7 Proben Milch von auf die angegebene Weise hergestellter steigender Acidität trat die Gerinnung durch Lab unter sonst gleichen Umständen um so rascher ein, je gröfser die Acidität der Milch war.

W. Heintz [2]) zeigte dann weiter, dafs die Versuche Soxhlets, welche nachzuweisen suchen, „dafs die Koagulation des Kaseins durch ein Infusum der Schleimhaut des Kälbermagens cetris paribus um so schneller geschieht, je mehr bei Beginn des Versuches die saure Reaktion vorherrscht," nicht für die Bildung von Milchsäure bei der Gerinnung durch Lab spreche, bestätigte aber, dafs die Gerinnung der Milch um so später erfolge, je mehr die ursprüngliche Acidität der Milch durch einen Zusatz von kohlensaurem Natron herabgedrückt würde. Adolf Mayer [3]) fand, dafs eine Milch in 73 Minuten, eine Probe derselben Milch, welche

1) a. a. O. S. 35.
2) Journ. f. prakt. Chem. N. f. 6, S. 381.
3) Milchzeitg. 10, S. 38.

11 Stunden bei 18° C. gestanden hatte, cet. par. in 42 Minuten durch Lab zur Gerinnung gebracht wurde, woraus derselbe schliefst, „dafs das Vorhandensein einer stärkeren Säure, auch wenn sie für sich selbst noch ungenügend ist, um die Milch allein zur Gerinnung zu bringen, doch der Gerinnung durch Lab sehr förderlich ist.“ Der Genannte giebt auch an, dafs die Gerinnungszeit durch einen Zusatz von Ätzkali zur Milch vergröfsert wird und zwar „wohl nur deshalb, weil dann etwas Labferment durch diese für seine Konstitution gefährliche Beimengung während der Zeit bis zur Gerinnung zerstört wird.“

In einem von mir ausgeführten Versuche zeigt sich der folgende Einfluſs einer Aciditätsverminderung der Milch durch Zusatz von $^1/_4$ Normal-Natronlauge zu 100 ccm frischer Milch, welche die mittlere Acidität von 3,5 besafs.

Zusatz von ccm $^1/_4$ Norm.-Natronlauge	Acidität der Milch	Gerinnungszeit
—	3,5	0,5 Min.
2 ccm	2,5	2,5 „
5 „	1,0	21,0 „
7 „	0,0	nach 2 Stunden nicht geronnen.

Diese Versuche zeigen sehr deutlich die Beziehungen zwischen Acidität und Gerinnungsdauer. Die mit 2 ccm $^1/_4$ Normal-Natronlösung versetzte Milch, welche noch amphotere Reaktion zeigte, und die bei normaler Milch nicht ganz seltene Acidität 2,5 besafs, gerann in 5 mal längerer Zeit, als die gleiche Milch ohne Alkalizusatz.[1])

1) Diese schon vor 3 Jahren gemachte Beobachtung, aus welcher sich ergab, dafs schon geringe Aciditätsunterschiede in der Milch, welche die Differenzen in der Acidität verschiedener Milchproben erreichen, sowie die bei der Prüfung von Handelslabpräparaten erhaltenen, oft sehr beträchtlichen Unterschiede in der Wirksamkeit, wenn das Präparat an verschiedenen Tagen, d. h. mit verschiedener Milch geprüft wurde, veranlafsten Herrn Prof. Dr. Soxhlet, für die Bestimmung der Wirksamkeit eines Labpräparates auch die Acidität der Milch zu normieren. Dementsprechend wird seit der angegebenen Zeit im hiesigen Laboratorium bei der Prüfung von Labpräparaten unter „Wirksamkeit“ jenes Verhältnis von Lab zu Milch verstanden, bei welchen Milch von der mittleren Acidität 3,5 (Soxhlet-Henkel) bei der Temperatur 35° C. in 40 Minuten zur Gerinnung gebracht wird; so z. B. haben die meisten Labflüssigkeiten des Handels eine Wirksamkeit von 1 : 10000, d. h. 1 Teil Labflüssigkeit bringt 10000 Teile Milch von der Acidität 3,5 in 40 Minuten bei 35° C. zur Gerinnung.

Wenn, wie schon bemerkt wurde, folgende Thatsachen im Zusammenhang stehen, nämlich:

dafs die Gerinnungsdauer bei der Koagulation der Milch durch Lab von der Acidität der Milch abhängt;

dafs eine Steigerung der Acidität auf die Gerinnbarkeit der Milch fördernd einwirkt und umgekehrt;

dafs gekochte aber nicht gerinnungsunfähig gewordene Milch (Milch von mittlerer Acidität) durch Säurezusatz eine Steigerung des Gerinnungsvermögens erleidet;

dafs durch Kochen nicht gerinnbar gemachte Milch (Milch von geringerer natürlicher Acidität) durch einen Säurezusatz wieder gerinnungsfähig gemacht wird;

so mufs Ursache und Wesen dieses Zusammenhanges durch die Beantwortung der folgenden Fragen zu ermitteln sein:

1. Welche Veränderungen erleidet die Milch beim Kochen?

2. Welche Veränderung erleidet die Milch durch einen Säure- oder Alkalizusatz, soweit Säure- und Alkalimengen in Betracht kommen, welche auf die Labgerinnung beschleunigend oder verlangsamend einwirken?

Die grundlegende Entdeckung Hammarstens, dafs die Gerinnung des Käsestoffes durch Lab von der Gegenwart von Kalksalzen abhängig ist, sowie das bisher niedergelegte Beobachtungsmaterial machen es wahrscheinlich, dafs die festzustellenden Veränderungen sich auf die Salze der Milch beziehen, weshalb die folgenden Untersuchungen auch nach dieser Richtung ausgeführt wurden.

Erhitzt man das Thonzellenfiltrat der Milch zum Kochen, so entsteht ein flockiger Niederschlag. 1 l Milch solchen Milchserums wurde zum Kochen erhitzt und der Niederschlag abfiltriert; die Menge des getrockneten Niederschlags betrug 0,446 g enthaltend 0,281 g Asche mit 0,152 g CaO. und 0,132 g P_2O_5 (zusammen 0,284 g). Der Niederschlag bestand aus 63 pCt. Asche und 37 pCt. organischer Substanz, letztere enthielt 17,6 pCt. N, war also eine Eiweifssubstanz (der Stickstoff ist jedenfalls zu hoch gefunden). Die Hauptmenge des Niederschlags bestand aus 63 pCt. Tricalciumphosphat (100 P_2O_5 : 115 CaO, im Tricalciumphosphat 100 : 118).

Beim Kochen des Milchserums für sich wird also aus bis dahin gelösten Phosphaten und Kalksalzen unlösliches Tricalciumphosphat gebildet, und die Lösung wird ärmer an Kalk und Phos-

phorsäure, und zwar ist pro 100 ccm Milch die Menge des gelösten Kalkes um 15 mg, die der gelösten Phosphorsäure um ca. 13 mg vermindert worden. Eine solche Ausscheidung unlöslichen Kalkphosphates durch Kochen einer Phosphorsäure und Kalk enthaltenden Lösung, hat nichts Auffälliges und kann vielfach beobachtet werden.

Was hier beim Kochen des Serums für sich stattfindet, geht auch beim Kochen der Milch selbst vor sich; es vermindert sich die Menge des gelösten Kalkes und der gelösten Phosphorsäure, indem sich unlösliches Calciumphosphat aus dem Milchserum abscheidet, wie der Vergleich des Thonzellenfiltrates gekochter und ungekochter Milch ergiebt. Es enthalten 100 ccm Thonzellenfiltrat Milligramme von:

	Nicht gekochter Milch		Gekochter Milch		Durch Kochen unlöslich geworden	
	CaO	P_2O_5	CaO	P_2O_5	CaO	P_2O_5
1	80	96	66	86	14	10
2	72	77	59	64	13	13
3	62	104	47	93	15	11

Das Verschwinden der Phosphorsäure aus dem Serum beim Kochen der Milch besteht also nicht darin, dafs, wie Eugling sagt, „Phosphorsäure aus dem Serum in die aufgequollene Käsestoffverbindung disloziert wird etc.“, sondern darin, dafs sich unlösliches Kalkphosphat ausscheidet.

In dem sozusagen durchsichtigeren Versuch mit Thonzellenfiltrat wurde diese Ausscheidung für sich gewonnen und untersucht, in dem vergleichenden Versuch über die Zusammensetzung des Serums gekochter und ungekochter Milch aus der Differenz im Kalk und Phosphorsäuregehalte beider berechnet, wobei zu bemerken ist, dafs die aus dem Serum verschwundenen Phosphorsäure- und Kalkmengen sich in einem solchen Verhältnis zu einander befinden, wie in unlöslichen Calciumphosphatverbindungen.

Veränderung der Milch durch Zusatz von Basen oder Säuren:

Versetzt man Thonzellenfiltrat tropfenweise mit verdünnter Natronlauge, so entsteht ein Niederschlag, welcher abfiltriert sich als aus Calciumphosphat bestehend erweist. Die Menge dieses Niederschlages hängt von der Menge des zugesetzten Alkalis ab; sie wurde nicht bestimmt, da es eigentlich selbstverständlich ist,

dafs aus einer schwach sauren Lösung, welche Alkaliphosphat und Kalksalze enthält, auf Zusatz von Natronlauge unlösliches Calciumphosphat ausfällt. Da, wie gezeigt wurde, beim Kochen der Milch selbst die Bildung unlöslichen Calciumphosphats ebenso vor sich geht, wie beim Kochen des Serums allein, so kann nach Analogie angenommen werden, dafs ebenso wie beim Serum auch beim Versetzen der Milch mit Alkali unlösliches Calciumphosphat aus bis dahin gelösten Phosphaten und Kalksalzen gebildet wird.

Die Wirkung eines Säurezusatzes zur Milch wurde schon früher mit Rücksicht auf eine andere Frage besprochen, es wurde dort (S. 35) gezeigt, dafs sowohl Kohlensäure als Essigsäure das in der Milch suspendierte Kalkphosphat zu lösen vermögen, und dafs dem entsprechend eine Anreicherung der Milch an gelösten Kalksalzen stattfinde. Durch Einleiten von Kohlensäure in die Milch wurde der Gehalt der letzteren an löslichen Kalksalzen pro 100 ccm in einer 12—40 mg Calciumoxyd entsprechenden Menge erhöht. Durch Zunahme der Acidität der Milch von 3,5 auf 8,5 wurde die Menge des gelösten Calciumoxydes pro 100 ccm Milch um 42 und durch Erhöhung der Acidität auf 11,0 um 74 mg vermehrt.

Die Veränderungen, welche die Milch in Bezug auf ihre Salze erleidet, bestehen nach vorstehendem also darin,

dafs beim *Kochen* der Milch oder nach *Zusatz eines Alkalis* der Gehalt des Serums an löslichen Kalksalzen *vermindert* wird, indem unlösliches Calciumphosphat ausgefällt wird;

dafs bei einem Säurezusatz resp. Einleiten von Kohlensäure in die Milch der Gehalt des Serums an löslichen Kalksalzen *vermehrt* wird, indem in der Milch suspendiert vorhandenes unlösliches Calciumphosphat gelöst wird.

Man kann nun in Bezug auf die hier aufgeworfene Frage und im Hinblick auf die Thatsache, dafs für das Zustandekommen der Labwirkung die im Serum gelösten Kalksalze eine notwendige Bedingung sind, während, wie früher nachgewiesen wurde, das in der Milch suspendierte unlösliche Kalkphosphat sich an dem Vorgange der Gerinnung der Milch durch Lab nicht beteiligt, folgende Schlufsfolgerungen ziehen.

1. Beim Kochen der Milch wird der Gehalt derselben an für die Labwirkung notwendigen *gelösten Kalksalzen verringert*, der

Gehalt der Milch an suspendiertem unlöslichen und für den Gerinnungsprozefs bedeutungslosen Calciumphosphat vermehrt; die *Verringerung* oder *Aufhebung* des Gerinnungsvermögens der Milch durch Kochen ist eine Folge des *verminderten* Gehalts der Milch an *löslichen Kalksalzen.*

2. Durch Alkalizusatz zur Milch resp. durch Verminderung der Acidität der Milch wird der Gehalt der letzteren an *löslichen Kalksalzen vermindert*; *die Verringerung* der Gerinnungsfähigkeit der Milch durch diesen Zusatz ist eine Folge des *verminderten* Gehaltes der Milch an *löslichen Kalksalzen.*

3. Durch einen Säurezusatz zur Milch, resp. durch Erhöhung der Acidität der Milch und durch Einleiten von Kohlensäure in die Milch wird der Gehalt der letzteren an *löslichen Kalksalzen vermehrt,* die *gesteigerte* Gerinnungsfähigkeit so behandelter Milch ist eine Folge des *vermehrten* Gehaltes derselben an *gelösten Kalksalzen.*

Wenn obige Folgerungen richtig sind und die günstige Einwirkung höherer Acidität der Milch auf den Verlauf des Gerinnungsvorgangs nicht etwa eine spezifische Wirkung auf die Fermentthätigkeit selbst ist (wie ja auch z. B. Pepsin- und Diastasewirkung ein Aciditätsoptimum haben), so mufs die durch einen Säurezusatz erzielte Nebenwirkung — die Vermehrung löslicher Kalksalze — von der direkten Wirkung der Aciditätssteigerung getrennt den gleichen Effekt äufsern, wie beide Wirkungen zusammen, d. h. es mufs eine Vermehrung der löslichen Kalksalze der Milch ohne Aciditätsänderung den gleichen Effekt der Labeinwirkung gegenüber zeigen, wie ein Säurezusatz zur Milch.

Hammarsten zeigte, dafs eine durch Verdünnung mit Wasser gerinnungsunfähig gemachte Milch durch einen Zusatz von Chlorcalcium wieder Gerinnungsfähigkeit erhielt; dafs die Gerinnung einer solchen Milch um so rascher eintrat, je mehr — bis zu einer gewissen Grenze — Chlorcalcium die verdünnte Milch enthielt. Ebenso verhielt sich eine reine, Calciumphosphat enthaltende Lösung von Kaseïn.

Das Gerinnungsunfähigwerden oder die verminderte Gerinnbarkeit einer mit Wasser verdünnten Milch ist ein anderer Fall, als wenn Milch durch Kochen gerinnungsunfähig wird, oder durch Alkalizusatz eine Verringerung der Gerinnungsfähigkeit erleidet.

Im ersteren Falle wird das Verhältnis von Kaseïn zu gelösten Salzen nicht geändert; es wird eher die auf 1 Teil Kaseïn treffende Menge löslicher Kalksalze durch den Wasserzusatz vermehrt, wie die Aciditätsbestimmungen mit verdünnter Milch ergaben und aus der nicht völligen Unlöslichkeit des in der Milch suspendierten Calciumphosphats von vornherein anzunehmen ist. Durch Kochen der Milch oder Alkalizusatz zu derselben wird hingegen das Verhältnis von Kaseïn zu löslichen Kalksalzen in der Richtung verändert, daſs die auf 1 Teil Kaseïn treffende Menge gelöster Kalksalze verringert wird.

Es ergiebt sich aber doch aus den Hammarstenschen Versuchen, daſs eine Vermehrung der löslichen Kalksalze an und für sich die Gerinnungsfähigkeit der Milch begünstigt; solch ein begünstigender Einfluſs der Vermehrung der löslichen Kalksalze ist demnach auch bei unverdünnter Milch zu erwarten, was denn auch die folgenden Versuche darthun:

Milch von der Acidität 3,0 gerann

ohne Zusatz in			$12^1/_2$ Minuten
mit Zusatz von	5 mg CaO	(= 10 mg $CaCl_2$) in	$9^1/_4$ „
„	10	„	$7^1/_2$ „
„	15	„	6 „

Dieselbe Milch durch Zusatz von 2 ccm $^1/_4$ Normal-Natronlauge zu 100 ccm Milch auf die Acidität 2,0 gebracht, gerann durch die gleiche Labmenge

ohne Zusatz in			59 Minuten
mit Zusatz von	5 mg CaO	(= 10 mg $CaCl_2$)	43 „
„	10	„	34 „
„	15	„	24 „

Ein Chlorcalciumzusatz zu frischer unveränderter Milch beschleunigt also die Gerinnung durch Lab. Die verringerte Gerinnungsfähigkeit einer Milch, deren Acidität durch Alkalizusatz vermindert wird, wird durch Zusatz von Chlorcalcium wieder gesteigert. In beiden Fällen handelt es sich um die gerinnungsbeschleunigende Wirkung relativ sehr geringer Mengen zugesetzter Kalksalze, Mengen, die erheblich geringer sind, als jene, die z. B. durch Einleiten von Kohlensäure in die Milch in Lösung gehen (bis 45 mg pro 100 ccm Milch, S. 382). Neben den hier klar ge-

gelegten Beziehungen zwischen Acidität, Gehalt der Milch an löslichen Kalksalzen und Gerinnungsvermögen der Milch kann wohl noch eine spezifische Wirkung einer passenden Acidität auf den Verlauf des Gerinnungsprozesses bestehen.

Wie schon erwähnt, besitzt auch die Diastase ein Aciditätsoptimum, und ebenso wie letztere ist auch das Labferment schon gegen geringe Mengen alkalisch reagierender Stoffe sehr empfindlich; es kann deshalb ganz wohl in einer Milch von geringer Acidität, oder, was hier dasselbe ist, in einer Milch von höherer Alkalinität, der Vorstellung Ad. Mayers (siehe S. 78) entsprechend das Labferment während der Einwirkung auf solche Milch geschwächt werden, worin ein weiteres Moment für die Gerinnungsverzögerung liegen würde. Indes scheint dieser Einfluſs gegenüber jenem, der durch die Verminderung der löslichen Kalksalze bedingt ist, in allen Fällen sehr zurückzutreten, wo es sich nicht um stärkere, bei natürlicher Milch nicht vorkommende Alkalinitäten handelt. Letzteres wird der Fall sein, wenn eine Milch mit soviel Alkali versetzt wird, daſs dieselbe nach Phenolphtaleïnbeigabe eben schon schwach rötlich gefärbt wird. Eine solche Milch gerinnt, wie früher gezeigt wurde, nicht mehr durch Lab, auch wenn man zu derselben eine relativ sehr groſse Labmenge hinzusetzt. So z. B. konnte eine Milch, welche ursprünglich die Acidität 3,0 besaſs und durch Beimischung von 6 ccm $^1/_4$ Normal-Natronlauge auf die Acidität 0,0 gebracht wurde, auch durch die 500mal gröſsere Menge Lab, als für die ursprüngliche Milch erforderlich war — durch 50 mg Labpulver — nicht mehr zur Gerinnung gebracht werden. Hierbei darf aber nicht vergessen werden, daſs durch den Zusatz relativ so groſser Mengen Alkalis das Kaseïn Base aufnimmt (wie das gröſsere Basenverbindungsvermögen von Milch gegenüber dem des Thonzellenfiltrates zeigt), und in die basische Verbindung übergeht.

Daſs in einer Milch von der hier angegebenen Alkalinität ein Teil des zugesetzten Fermentes wirklich getötet wird, andererseits aber auch das Ausbleiben der Gerinnung nicht allein auf erfolgte Abtötung des Labs zurückzuführen ist, zeigt folgender Versuch.

100 ccm von der Acidität 3,0 gerannen in 2,7 Minuten,
100 „ „ „ „ 0,0 wurden nach 2,7 Minuten wieder auf die Acidität 3,0 gebracht und gerannen nach 16 Minuten.

Da an früherer Stelle der Thatsache Erwähnung geschah, das beim Vermischen einer neutral reagierenden Chlorcalciumlösung mit einer gegen Lackmus alkalisch reagierenden Lösung von Dinatriumphosphat ein sauer resp. amphoter reagierendes Gemisch entsteht, so könnte der die Labeinwirkung begünstigende Einfluſs eines Chlorcalciumzusatzes zur Milch, als einer Dinatriumphosphat enthaltenden Lösung, auf eine etwaige Aciditätsvermehrung an sich zurückgeführt werden. Im Hinblicke hierauf sei mitgeteilt, daſs bei den hier in Betracht kommenden Mengen beider Agenzien eine wahrnehmbare Aciditätssteigerung der Milch nicht eintritt.

Der Sinn des Vorwurfs, welchen Schaffer[1]) ausspricht, daſs man „bisher die Wichtigkeit der Gegenwart einer Säure für die Labwirkung viel zu wenig betont habe", ist sehr schwer zu verstehen, denn Säuren sind ja immer in der Milch und zwar in ziemlich konstanten Mengen enthalten; aber gebunden an Basen in der Form von Salzen; freie Säuren aber, wie ja längst bekannt, in der frischen ungeronnenen Milch überhaupt nicht vorkommen, sondern nur saure Salze; aber auch diese sind in der Milch, wie die amphotere Reaktion der Milch anzeigt, immer vorhanden und wie die unveränderte Acidität gekochter Milch beweist, in gekochter nicht gerinnbarer Milch in nicht geringerer Menge, als in ungekochter gerinnbarer. Nachdem was hier vorgebracht wurde, wäre der Vorwurf viel gerechtfertigter, daſs man bisher dank der irrigen Annahme, die Gerinnung des Kaseïns sei an die Calciumphosphate geknüpft oder der Käsestoff sei eine chemische Verbindung von Kaseïn mit Calciumphosphat, die Bedeutung der löslichen Kalksalze des Serums für die Gerinnung der Milch durch Lab unterschätzt habe.

Die Wirkung eines Chlorcalciumzusatzes zu gekochter Milch wurde gleichzeitig in jenen Versuchen ermittelt, in welchen auch die Wirkung eines Phosphorsäurezusatzes festgestellt worden war. Die Resultate dieser Versuche seien hier mit Wiederholung der früher mitgeteilten Daten wie folgt mitgeteilt.

---

1) a. a. O.

Milch B natürliche Acidität 2,9.

100 ccm Milch + 4 mg Labpulver gelöst in 2 ccm destilliertem Wasser.

	Sofort nach dem Kochen Minuten	6 Stunden später Minuten	24 Stunden später geprüft Minuten
Milch ungekocht	1,5	—	—
„ gekocht	5,6	gerinnungsunfähig	
„ „ + 40 mg P_2O_5	4,5	6	10
„ „ + 20 „ CaO (= 40 mg $CaCl_2$)	2,0	2,5	2,5

Milch C, auf Acidität 3,5 gebracht.

Milch ungekocht	0,7	—	—
„ gekocht	9	12	23
„ „ + 40 mg P_2O_5	2,5	3,5	4,0
„ „ + 20 „ CaO (= 45 mg $CaCl_2$)	2,0	2,5	2,5

Eine andere Milch, von der natürlichen Acidität 3,0, war nach dem Kochen und mehrstündigem Stehen gerinnungsunfähig; in frischem Zustande gerann dieselbe mit 1 mg Labpulver (gelöst in 2 ccm Wasser) versetzt nach 5,5 Minuten.

100 ccm Milch gekocht (gerinnungsunfähig gemacht) mit Zusatz von

„	„	+ 10 mg	CaO	in 20 Minuten	
„	„	+ 20	„	„ 9,5	„
„	„	+ 40	„	„ 5,0	„
„	„	+ 60	„	„ 3,0	„

In den früher mitgeteilten Versuchen über die Bildung von unlöslichem Kalkphosphat beim Kochen der Milch wurde dargelegt, daſs durch letzteren Vorgang der Gehalt der Milch an löslichen Kalksalzen um eine etwa 15 mg CaO pro 100 ccm entsprechende Menge verringert wird.

Im Versuch mit Milch B konnte durch den Zusatz eines löslichen Kalksalzes, entsprechend einer Menge = 20 mg pro 100 ccm, also nicht erheblich mehr, als in der Milch durch Kochen unlöslich gemacht wird, das ursprüngliche Gerinnungsvermögen der ungekochten Milch fast ganz wieder hergestellt werden (1,5—2 Min. Gerinnungsdauer).

Im Versuch mit Milch C wurde durch den gleichen Chlorcalciumzusatz zwar nicht das ursprüngliche Gerinnungsvermögen wieder ganz hergestellt, die Gerinnungsdauer aber bedeutend ab-

gekürzt, während andererseits der zuletzt mitgeteilte Versuch beweist, dafs schon ein geringer Zusatz eines löslichen Kalksalzes — 10 mg CaO — als jener Menge entspricht, welche durch Kochen aus dem Serum verschwindet, eine gerinnungsunfähig gewordene Milch wieder gerinnungsfähig gemacht werden kann. Wenn auch zugegeben werden mufs, dafs noch andere Veränderungen beim Kochen der Milch eintreten, welche den Gerinnungsprozefs durch Lab ungünstig beeinflussen, so ist doch durch die vorstehenden Versuche der Nachweis erbracht, dafs das Verschwinden des Gerinnungsvermögens gekochter Milch resp. die Abschwächung desselben in der Hauptsache und im wesentlichen darin beruht, dafs der Gehalt der Milch an löslichen Kalksalzen durch Bildung unlöslichen Kalkphosphates verringert wird.

Bei der Wiederherstellung des Gerinnungsvermögens gekochter Milch wirkt am geeignetsten ein Zusatz löslicher Kalksalze oder Einleiten von Kohlensäure, von welch letzterem Hilfsmittel Schaffer gezeigt hat, dafs seine gerinnungsbefördernde Wirkung sogar soweit geht, dafs gekochte Milch unter fortwährendem Kohlensäure-Einleiten rascher zur Gerinnung gebracht wird, als ungekochte Milch ohne Kohlensäurebehandlung, eine Angabe, die ich bestätigen kann.

Die Überlegenheit dieses Mittels gegenüber dem Zusatze anderer Säuren beruht darin, dafs durch Einleitung von Kohlensäure verhältnismäfsig grofse Mengen von dem in der Milch suspendierten Kalkphosphat gelöst werden und zwar bis etwa dreimal so viel Calciumoxyd (49 mg pro 100 ccm Milch), als in der Milch durch Kochen unlöslich gemacht wird, ohne dafs sonst eine wesentliche Änderung in der Milch durch die in grofsem Überschufs anwendbare Säure hervorgerufen wird. Andere Säuren lassen sich nicht in so grofsen Mengen anwenden, ohne die Eigenschaft der Milch auch sonst noch zu verändern — Gerinnung beim Kochen — und wirken, weil nur sehr verdünnt, nicht so lösend auf das durch Kochen schwer löslich gewordene Kalkphosphat der Milch. Demgemäfs beobachtet man auch bei Anwendung von Kohlensäure oder eines Zusatzes löslicher Kalksalze zur gekochten Milch, dafs die Eigenschaften des abgeschiedenen Käsestoffes in Bezug auf Konsistenz mehr jenen aus ungekochter Milch gleichen. Während das Gerinnsel aus gekochter und mit Phosphorsäure versetzter Milch flockig

ist, und sich erst nach längerem Stehen zu einer mehr oder weniger zusammenhängenden Masse zusammenballt, erhält man bei Einleiten von Kohlensäure in gekochte Milch oder bei einem Zusatz entsprechender Mengen löslicher Kalksalze ein fast normales, gallertartiges und zusammenhängendes Koagulum. — Ebenso wie Chlorcalcium verhält sich essigsaurer oder citronensaurer Kalk, die eine dem Calciumoxyd entsprechende Wirkung äufsern.

Vorliegende Arbeit wurde im Laboratorium der Landwirtschaftlichen Central-Versuchsstation in München unter Leitung des Herrn Prof. Dr. Soxhlet ausgeführt, dem ich für seine mannigfachen Anregungen und seine Unterstützung aufrichtigen Dank ausspreche.